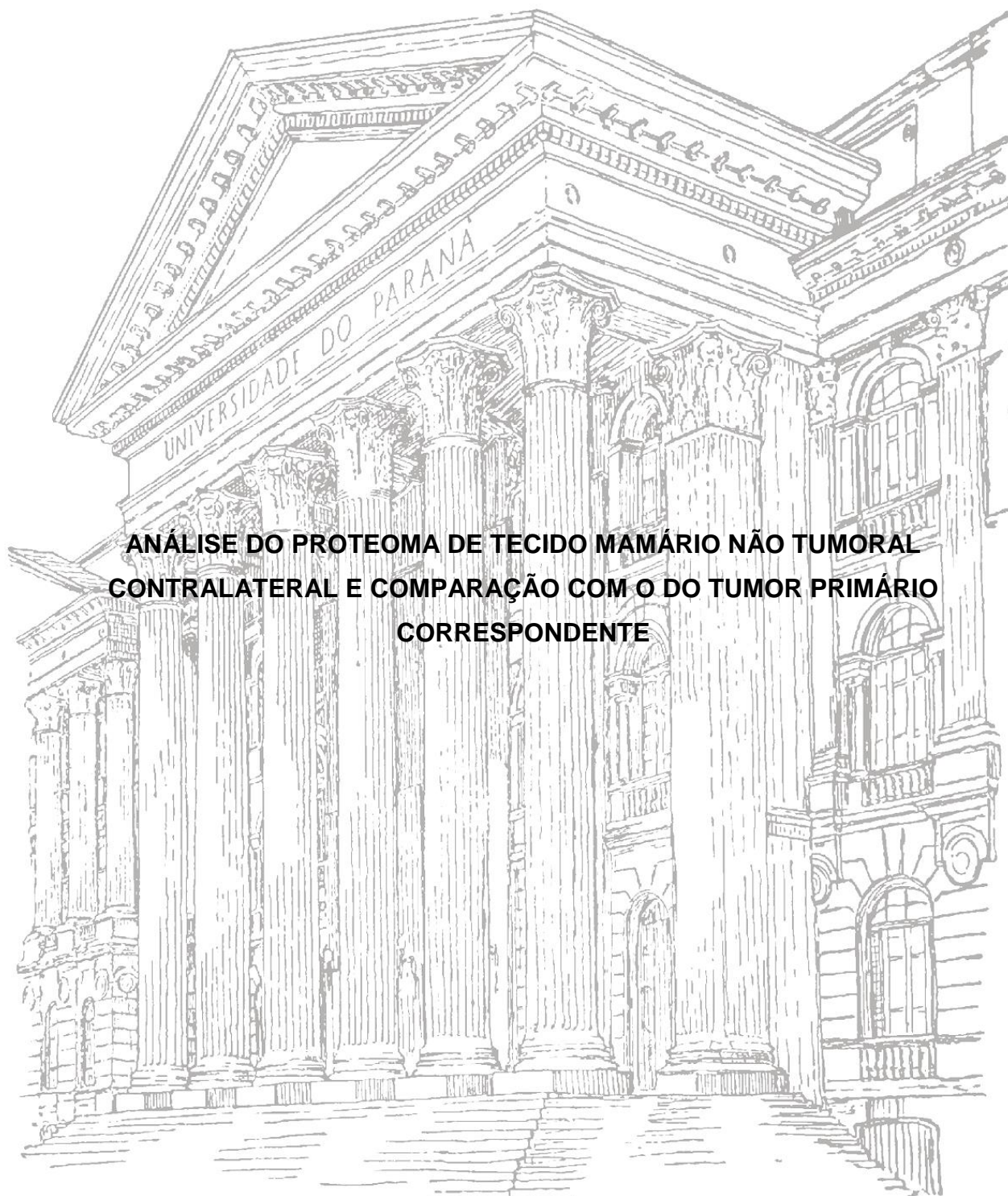


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TALITA HELEN BOMBARDELLI GOMIG



**ANÁLISE DO PROTEOMA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL  
CONTRALATERAL E COMPARAÇÃO COM O DO TUMOR PRIMÁRIO  
CORRESPONDENTE**

CURITIBA

2015

TALITA HELEN BOMBARDELLI GOMIG

**ANÁLISE DO PROTEOMA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL  
CONTRALATERAL E COMPARAÇÃO COM O DO TUMOR PRIMÁRIO  
CORRESPONDENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglenir João Cavalli  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Gomig, Talita Helen Bombardelli

Análise do proteoma de tecido mamário não tumoral contralateral e comparação com o do tumor primário correspondente. / Talita Helen Bombardelli Gomig. – Curitiba, 2015.

143 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Iglênir João Cavalli

Co-orientador: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

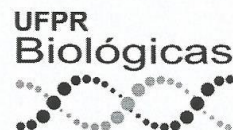
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Cancer 2. Proteômica I. Título II. Cavalli, Iglênir João III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.99249



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **TALITA HELEN BOMBARDELLI GOMIG**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de março de 2015

**Doutor Cícero de Andrade Urban**  
Universidade Positivo – Membro Titular

**Doutor Luiz Eduardo Rizzo de Souza**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

**Doutor Iglênir João Cavalli**  
Universidade Federal do Paraná – Orientador e Presidente da Banca

Visto

**Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza**  
Coordenador do PPG - GEN - UFPR  
Matrícula 176702

**Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus orientadores, Prof. Dr. Iglenir João Cavalli e Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, pela oportunidade e orientação conferida durante todos esses anos. É com grande satisfação que agradeço a dedicação, o carinho, a amizade e, de forma singular, a confiança que demonstraram por mim e meu trabalho.*

*À Profa. Dra. Roseli Wassen, meus sinceros agradecimentos pela atenção e dedicação conferidas. Pela orientação na parte técnica deste estudo e, ainda, pelo carinho e amizade.*

*A todos os amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética e àqueles que já fizeram parte do nosso grupo de pesquisa, pela convivência, amizade e pelos momentos de descontração e alegria. Em especial, aos que dedicaram seu tempo e seus esforços para me ajudar a concluir este trabalho. A contribuição de vocês foi de grande valia e estimo muito a colaboração e o carinho de cada um.*

*A todos os amigos e amigas que compartilharam destes anos dedicados ao estudo, especialmente aos que se tornaram “família”. Em suas particularidades, vocês preencheram meus dias de incentivos e carinho. Muito obrigada!*

*Aos meus familiares, família em si e àqueles que a vida nos dá de presente, agradeço pela motivação e auxílio em todos os momentos. Por confiarem e acreditarem na minha capacidade e permitirem a conclusão de tantos projetos pessoais e profissionais, incentivando, inclusive, a busca por novos sonhos e conquistas sem ao menos encerrar os atuais. Meus sinceros agradecimentos pelo amor e carinho imensuráveis e por serem ou tornarem-se parte indissociável da minha vida. Em especial, ao Adriano, pelo carinho, cumplicidade e companheirismo em todos esses anos. Por sempre me apoiar e partilhar de tantos momentos e conquistas. Muito obrigada por tudo!*

*À todas as instituições envolvidas nesta pesquisa, aos Drs. Cícero Urban e Rubens Lima e aos funcionários do Hospital Nossa Senhora das Graças, e à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.*

*A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, afetiva ou profissionalmente, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!*

*“Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas...”*

*Luis Fernando Veríssimo*

## RESUMO

A glândula mamária humana apresenta uma estrutura complexa, com um sistema integrado de renovação tecidual, regulado por diversos fatores que, em conjunto, atuam no remodelamento cíclico da mama. As constantes alterações na estrutura e nos níveis de fatores reguladores do desenvolvimento podem predispor o tecido a doenças mamárias, incluindo o câncer. A tumorigênese mamária é um evento complexo, com diferentes proteínas envolvidas. Alterações na expressão de proteínas-chave podem comprometer múltiplas vias relacionadas à proliferação, inibição da apoptose, migração, invasão e metástase. O estabelecimento do perfil proteico para o tecido mamário não tumoral, incluindo o contralateral pela sua localização em relação ao tumor, é fundamental para caracterizar a mama em estado saudável e possibilitar a inferência de alterações envolvidas na transformação e progressão neoplásica. Neste contexto, a proteômica consiste em um método de relevância para a caracterização de proteomas, contribuindo para a identificação de biomarcadores de utilidade no diagnóstico, na terapêutica e no prognóstico. No presente estudo, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) combinada com a espectrometria de massa MALDI-TOF foram utilizadas para analisar as proteínas expressas pelo tecido mamário não tumoral contralateral, comparando com respectivas amostras de tumor. Cento e dez *spots* foram identificados e corresponderam a 62 proteínas distintas, categorizadas em nove classes funcionais. Para 45 *spots*, verificou-se a mesma identificação no tecido não tumoral da mama com o tumor e o *matching* entre este e o tecido contralateral indicou relevante similaridade entre ambos. A comparação com o tumor primário resultou na identificação de seis proteínas diferencialmente expressas, sendo duas exclusivas para o tumor, duas para o tecido contralateral e três comuns a ambos, com expressão elevada no tecido sadio. Os dados apresentados fornecem informações adicionais para a caracterização do tecido mamário não tumoral e indicam proteínas que podem ter função na tumorigênese mamária como alvos relevantes para futuras análises.

Palavras-chave: Câncer de mama; tecido mamário não tumoral contralateral; proteoma; proteômica



## ABSTRACT

The human mammary gland presents a complex cellular structure, with an integrated system of tissue renewal that is controlled by several factors acting in cyclic remodeling of the breast. Continuous changes in the structure and in the levels of development-regulating factors may predispose the breast tissue to diseases, including cancer. The mammary tumorigenesis is a complex event, with different proteins involved. Expression changes in protein keys can compromise multiple pathways related to cell proliferation, inhibition of apoptosis, migration, invasion and metastasis. The establishment of the protein profile to the non-tumoral breast tissue, including the contralateral tissue according to its location in relation to the tumor, is essential to characterize the breast in healthy state and can allow the inference of changes involved in the transformation and neoplastic progression. In this context, the proteomics consists in an important method for the characterization of proteomes, contributing for the identification of useful biomarkers in the diagnosis, treatment and prognosis. In the present study, the two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) combined with mass spectrometry MALDI-TOF were used to analyze the proteins expressed in contralateral non-tumor breast tissue, compared with the respective tumor samples. There was identified 110 spots and corresponded for 62 distinct proteins, categorized into nine functional classes. For 45 spots, the same identification was found in contralateral and ipsilateral non-tumor breast tissues, indicated relevant similarity between both healthy tissues. Comparison with primary tumor resulted in the identification of six differentially expressed proteins, two exclusive for tumor tissue, one for the contralateral tissue and three were common, with increased expression in healthy tissue. These data provide additional information for the characterization of non-tumor breast tissue and indicate proteins that may have function in the mammary tumorigenesis as relevant targets for future analysis.

**Keywords:** Breast cancer; contralateral non-tumor breast tissue; proteome; proteomics.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MAMA FEMININA .....	18
FIGURA 2 – DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA EM ROEDORES ..	21
FIGURA 3 - ESQUEMA DA MORFOGÊNESE MAMÁRIA EM CAMUNDONGOS....	22
FIGURA 4 – MORFOLOGIA DOS DUCTOS MAMÁRIOS .....	24
FIGURA 5 – HABILIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS CANCEROSAS .....	32
FIGURA 6 – MODELO HIPOTÉTICO DE PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO .....	33
FIGURA 7 – ALTERAÇÕES EPITELIAIS E ESTROMAIS NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO .....	34
FIGURA 8 - ETAPAS DA PROGRESSÃO METASTÁTICA DE UM TUMOR.....	35
FIGURA 9 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO DE MASSA COM DESSORÇÃO/ IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO (MALDI-TOF) .....	38
FIGURA 10 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DAS AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL .....	53
FIGURA 11 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DAS AMOSTRAS DE TECIDO DO TUMOR .....	53
FIGURA 12 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL .....	55
FIGURA 13 – <i>SPOTS</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE O TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E O TUMOR.....	65
FIGURA 14 – DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO PARA OS <i>SPOTS</i> IDENTIFICADOS NA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E TUMOR.....	67
FIGURA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TECIDOS NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DA MAMA COM O TUMOR .....	70

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	43
QUADRO 2 - PROGRAMA PARA O ETTAN IPGPHOR II (TIRA DE 13CM; PH 4-7) .....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS .....	51
TABELA 1 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS .....	52
TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO .....	57
TABELA 3 – PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE O TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E O TUMOR E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO .....	68

## **LISTA DE GRÁFICOS**

GRÁFICO 1 – CLASSES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS .....	64
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensional

2D-PAGE – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

BSA – *Bovine serum albumine* (albumina de soro bovino)

CD – Carcinoma ductal

CDI – Carcinoma ductal invasor

CIS – Carcinoma *in situ*

CL – Carcinoma lobular

CLI – Carcinoma lobular invasor

CHAPS – Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato

Da – Dalton

DTT – Ditionitrito

ELISA – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)

ESI – Ionização por eletrospray

GH – Hormônio do crescimento

HCCA – Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hixiamínico

HER2 (ErbB2) – Receptor de fator de crescimento epidermal 2

HNSG – Hospital Nossa Senhora das Graças

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)

IEF – Focalização isoeletrica / Isoeletrofocalização

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1

IHC – Imunohistoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPG – Gradiente de pH imobilizado

kDa – Quilodalton

Ki-67 – Antígeno marcador de proliferação celular

LabCHO – Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética

LMW – Marcador de massa molecular

m/z – Razão massa carga

MALDI – *Matrix-assisted laser desorption-ionization* (dessorção por laser ionizante assistida por uma matriz)

MaSC – *Mammary stem cells* (células-tronco mamárias)

MEC – Matriz extracelular

MM – Massa molecular

MMP – Metaloproteinase de matriz

MPT – Modificação pós-traducional

MS – *Mass spectrometry* (espectrometria de massa)

MS/MS – Epectrometria de massa em tandem

NAF – *Nipple aspirate fluid* (fluido do aspirado de mamilo)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)

NOS – *Not otherwise specified* (não especificado de outra forma)

NST – *No special type* (tipo não especial)

NTC – Tecido mamário não tumoral contralateral

OMS – Organização Mundial da Saúde

pI – Ponto isoelétrico

PMA – *Protein microarray* (microarranjo de proteína)

PMF – *Peptide mass fingerprint* (impressão digital de peptídeos)

PMSF – Fluoreto de fenil-metil-sulfonilo

ppm – Partes por milhão

RE – Receptor de estrogênio

RP – Receptor de progesterona

SELDI – *Surface-enhanced laser desorption ionization* (dessorção por *laser* superfície-*enhanced*)

SDS – Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

T – Tecido mamário do tumor primário

TEM – Transição epitelial-mesenquimal

TEMED – Tetrametiletilenodiamino

TFA – Ácido trifluoroacético

TMA – *Tissue microarray* (microarranjo de tecido)

TME – Transição mesenquimal-epitelial

TNM – Sistema de Classificação de Tumores Malignos

TOF – Tempo de voo

$\Delta MM$  – Variação entre a massa molecular teórica e a experimental

$\Delta pI$  – Variação entre o ponto isoelétrico teórico e o experimental



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA .....	18
2.1.1 Estrutura do tecido mamário .....	18
2.1.2 Desenvolvimento da glândula mamária.....	20
2.2 O CÂNCER DE MAMA.....	26
2.2.1 Aspectos Epidemiológicos e Etiológicos .....	26
2.2.2 Classificação dos tumores de mama.....	28
2.2.3 A tumorigênese mamária .....	31
2.3 PROTEÔMICA .....	36
2.3.1 O método proteômico .....	36
2.3.2 A proteômica e o câncer de mama.....	39
3 OBJETIVOS .....	42
3.1 OBJETIVO GERAL .....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	43
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	44
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	44
4.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE) .....	45
4.4.1 Primeira dimensão .....	45
4.4.2 Segunda Dimensão .....	46
4.4.2.1 Equilíbrio das Tiras de IPG.....	46
4.4.2.2 Preparação do Gel 2D e Corrida Eletroforética SDS-PAGE.....	46

4.4.2.3 Fixação das proteínas e coloração do gel 2D .....	47
4.5 DIGITALIZAÇÃO DO GEL 2D E ANÁLISE DAS IMAGENS.....	47
4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL 2D.....	47
4.6.1 Excisão e digestão dos <i>spots</i> de interesse.....	47
4.6.2 Análise dos espectros de massas .....	49
4.6.3 Identificação das proteínas.....	49
5 RESULTADOS .....	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL .....	54
5.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E RESPECTIVO TUMOR PRIMÁRIO DE MAMA .....	65
5.3 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TECIDOS NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DA MAMA COM O TUMOR .....	69
6 DISCUSSÃO .....	71
6.1 ABORDAGEM PROTEÔMICA NO ESTUDO DO TECIDO MAMÁRIO .....	71
6.2 CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL .....	73
6.2.1 Classes funcionais identificadas.....	76
6.2.1.1 Citoesqueleto e proteínas associadas (24,2%) .....	76
6.2.1.2 Proteínas com função de ligação/ transporte (21%).....	78
6.2.1.3 Enzimas metabólicas (12,9%) .....	81
6.2.1.4 Proteínas redox e de detoxificação (11,3%).....	83
6.2.1.5 Chaperonas moleculares e proteínas <i>heat shock</i> (8,1%).....	84
6.2.1.6 Reguladores da proliferação e do crescimento celular (4,8%) .....	85
6.2.1.7 Proteínas associadas à membrana (4,8%).....	86
6.2.1.8 Biossíntese de proteínas (1,6%) .....	87
6.2.1.9 Outras funções (11,3%).....	88
6.3 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E RESPECTIVO TUMOR PRIMÁRIO DE MAMA .....	89

6.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TECIDOS NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DA MAMA COM O TUMOR .....	94
7 CONCLUSÕES .....	96
REFERÊNCIAS.....	97

## 1 INTRODUÇÃO

A glândula mamária apresenta uma estrutura complexa, cuja manutenção e funcionalidade dependem de redes interconectadas de sinalização. As interações entre os diversos tipos celulares que a compõem são fundamentais para o desenvolvimento normal da mesma.

O remodelamento cíclico, característico da mama, é desencadeado pela exposição periódica a hormônios e reguladores da proliferação celular, os quais determinam mudanças no número e composição celular bem como na arquitetura e funcionalidade da glândula (DJONOV, ANDRES e ZIEMIECKI, 2001). Essa complexidade é de relevância para a suscetibilidade a doenças mamárias (NAVARRETE *et al.*, 2005).

Dentre estas, o câncer de mama representa uma importante questão de saúde pública, uma vez que constitui a segunda neoplasia mais frequente no mundo e a mais comum entre as mulheres. No Brasil, as estimativas para os anos de 2014 e 2015 indicam a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, sendo o de mama responsável por 57.120 destes, com um risco estimado de 56,09 casos para cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2014).

A tumorigênese mamária é de etiologia complexa, com diversos fatores contribuindo para a malignidade, e, neste processo, diferentes proteínas estão envolvidas. Segundo Hondermarck e colaboradores (2008), análises comparativas entre amostras de carcinoma mamário e de tecido não tumoral demonstram que a expressão diferencial de determinadas proteínas pode ser relevante na carcinogênese.

Nesse contexto, a proteômica consiste em um importante método para identificar a expressão diferencial de proteínas em estágios distintos da progressão do tumor, uma vez que permite a caracterização do conteúdo proteico de amostras biológicas, possibilitando a identificação de proteínas expressas sob condições fisiológicas específicas.

O estudo de proteomas representa uma relevante fonte de informações sobre o funcionamento do organismo e, a nível molecular, permite a elucidação dos mecanismos intrínsecos das células. Bakry e colaboradores (2011) enfatizam a importância das análises do padrão de expressão proteica global associado a

processos fisiológicos, patológicos e relacionados ao desenvolvimento. Especificamente, na patogênese do câncer, perfis proteicos podem contribuir para o diagnóstico precoce, estadiamento, monitoramento terapêutico e prognóstico da doença.

A pesquisa por potenciais biomarcadores da neoplasia mamária requer o conhecimento prévio do padrão de proteínas expressas pelo tecido saudável, o que possibilita uma maior compreensão da biologia da glândula e permite a inferência de possíveis alterações relacionadas ao processo de carcinogênese.

A mama contralateral constitui uma amostra de importância singular para a análise de tais aspectos por representar, em teoria, o padrão de “normalidade” da glândula. Dessa forma, o tecido não tumoral contralateral pode fornecer informações essenciais para o entendimento dos componentes e vias de sinalização envolvidas na progressão da neoplasia, auxiliando no diagnóstico, prognóstico e procedimentos terapêuticos. A comparação dos proteomas de tecidos mamários em condições sadias e patológicas pode indicar proteínas relevantes para a compreensão do processo da carcinogênese, bem como alterações importantes em vias bioquímicas e mecanismos biológicos que atuam para a manutenção das integridades celular e genômica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA

#### 2.1.1 Estrutura do tecido mamário

A glândula mamária consiste em um órgão secretor complexo, composto por diversos tipos celulares que formam entrelaçadas redes de interações, essenciais para o seu desenvolvimento e funções fisiológicas normais (POLYAK e KALLURI, 2010).

A estrutura da glândula mamária compreende um compartimento glandular/epitelial, constituído por um sistema ramificado de ductos, e um estroma de tecido conectivo e adiposo, com alta vascularização (FIGURA 1). A porção glandular consiste de 15 a 20 lobos que são compostos por numerosas unidades ducto-alveolares terminais (lóbulos), contendo de 10 a 100 alvéolos; as células secretoras destes são responsáveis pela produção de leite, o qual é conduzido por um sistema de ductos que converge no mamilo (HONDERMARCK, 2003; HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

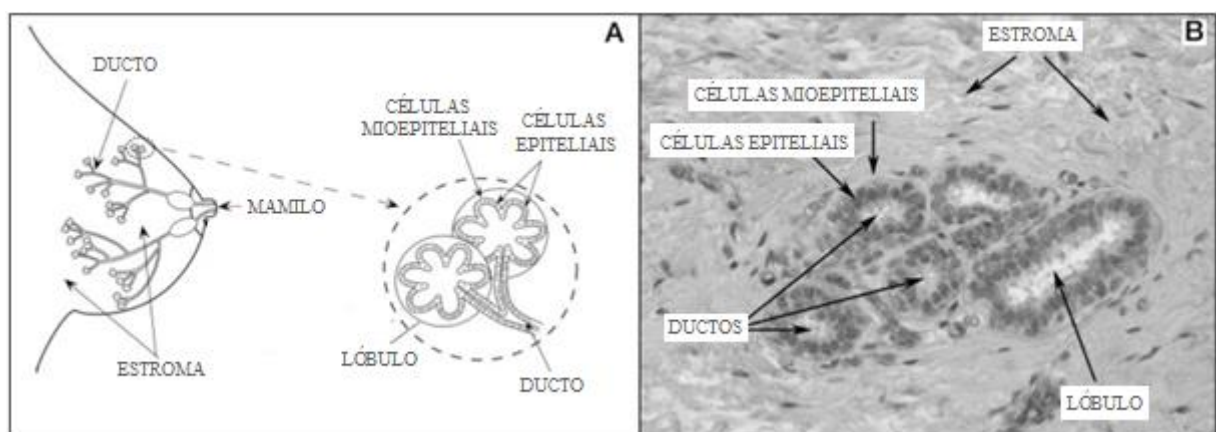


FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MAMA FEMININA

FONTE: Adaptado de Hondermarck (2003)

NOTA: (A) Esquema anatômico e (B) corte histológico da glândula mamária humana.

Os dois principais tipos celulares que compõem o epitélio mamário consistem nas linhagens basal e luminal. A primeira compreende células mioepiteliais, que formam a camada externa da glândula, e uma pequena população de células-tronco,

responsável pela reposição celular. O epitélio luminal forma os ductos e os alvéolos e apresenta células definidas pelo seu status de receptor hormonal; as células alveolares possuem potencial de diferenciação em células secretoras de leite (lactócitos), durante o período de lactação. Assim, ductos e lóbulos mamários maduros são revestidos por duas camadas de células epiteliais: a exterior é composta por células mioepiteliais contráteis e o revestimento interno por células luminais (VISVADER, 2009; GJOREVSKI e NELSON, 2011; MACIAS e HINCK, 2012). Nutrientes e água são secretados por células alveolares e luminais, enquanto células mioepiteliais promovem a circulação do leite ao longo dos ductos da glândula mamária (VAN KEYMEULEN, *et al.*, 2011).

As células mioepiteliais influenciam a organização tecidual da glândula mamária, incluindo aspectos como diferenciação, polaridade, proliferação, migração e invasão de células luminais adjacentes, além de produzirem a membrana basal, que forma uma barreira física entre os compartimentos epitelial e estromal (POLYAK e KALLURI, 2010).

A matriz extracelular (MEC), que representa o maior componente do microambiente celular, possui funções críticas na morfogênese tecidual normal e na progressão de patologias. A sinalização da MEC, determinada pela ativação de receptores específicos, condiciona a arquitetura celular e a expressão gênica, cooperando com fatores hormonais para a regulação da migração celular, diferenciação e transformação. Esta sinalização é sutilmente regulada durante o desenvolvimento da glândula mamária, e alterações no funcionamento de suas proteínas são suficientes para promover a carcinogênese e sua progressão (ZHU, *et al.*, 2014).

A população celular que compõe o estroma mamário compreende fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e células do sistema imune, além de células mesenquimais, que são altamente responsivas à sinalização hormonal do microambiente (GJOREVSKI e NELSON, 2011; HASSIOTOU e GEDDES, 2012). A influência do estroma no desenvolvimento mamário ocorre através de sinais bioquímicos e biomecânicos necessários para a arquitetura e funções celulares, regulando processos essenciais, como a morfogênese da ramificação dos ductos mamários (BOUDREAU, VAN'T VEER e BISSELL, 2012).

Populações de células-tronco mamárias (*mammary stem cells* – MaSC) bipotentes também são encontradas no compartimento estromal. A presença destas



é relevante para a homeostase da glândula mamária, uma vez que são responsáveis por originar o epitélio maduro de ambas as linhagens, luminal e mioepitelial, através de uma série de intermediários. Essas células tronco também atuam na expansão epitelial que ocorre durante a puberdade e gravidez (VISVADER, 2009).

### 2.1.2 Desenvolvimento da glândula mamária

Diferente da maioria dos órgãos, o desenvolvimento da glândula mamária ocorre principalmente após o nascimento e é completado apenas na idade adulta, sendo que alguns aspectos da diferenciação celular epitelial só são alcançados durante a gravidez/lactação (POLYAK e KALLURI, 2010).

O curso do desenvolvimento mamário humano pode ser descrito em estágios distintos e diferencialmente regulados, incluindo as fases embrionária, neonatal/pré-puberal e pós-puberal, e involução pós-menopausa. Ciclos de gravidez/lactação, e posterior involução pós-lactação, também caracterizam etapas pelas quais a glândula mamária pode se desenvolver (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

Interações heterotípicas promovem o remodelamento cíclico, característico da glândula mamária. A regulação da proliferação e da diferenciação é dinâmica, incluindo sinalização hormonal, de células vizinhas (moléculas relacionadas à interação célula-célula) e de componentes do microambiente, como fatores de crescimento (PAGE *et al.*, 1999; HONDERMARCK, 2003).

Interações célula-célula e célula-microambiente têm sido descritas modificando aspectos relacionados à proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e capacidade de invasão das células epiteliais mamárias; anormalidades nessas interações podem ser importantes na tumorigênese mamária (POLYAK e KALLURI, 2010).

O desenvolvimento do tecido mamário é semelhante entre os mamíferos. Muitos estudos relativos à glândula mamária utilizam o camundongo como modelo animal, apesar das diferenças hormonais existentes entre este e humanos. Isso se deve ao fato de o tecido mamário do roedor ser passível de manipulações sofisticadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, permitindo investigar os mecanismos subjacentes às interações celulares e regulação hormonal (POLYAK e KALLURI, 2010; MACIAS e

HINCK, 2012). A figura 2 representa o desenvolvimento da glândula mamária em roedores.

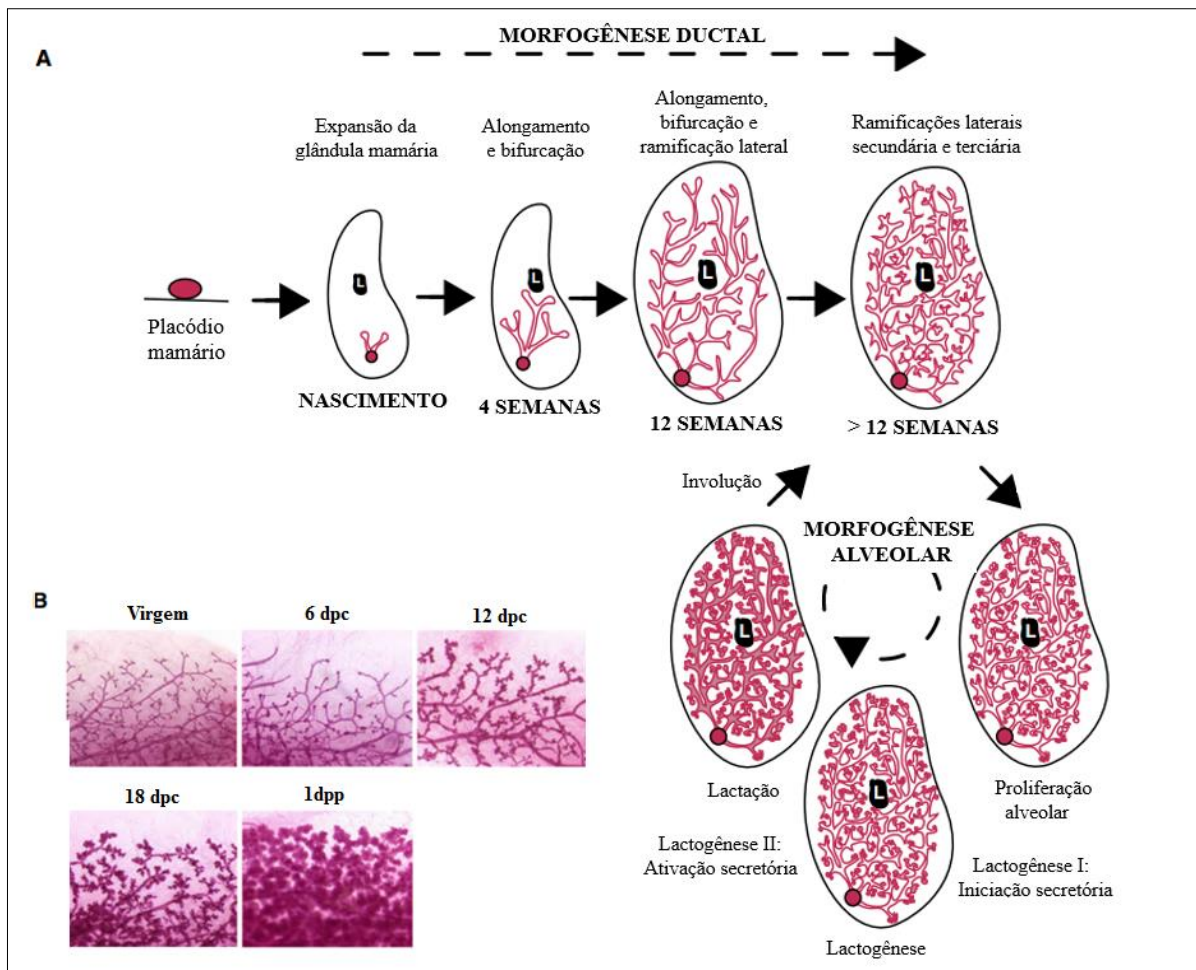


FIGURA 2 – DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA EM ROEDORES

FONTE: Adaptado de Oakes, Gallego-Ortega e Ormandy (2014)

NOTA: (A) A glândula mamária tem seu desenvolvimento iniciado a partir de placódios que se desenvolvem no epitélio mamário, ao nascimento. Este cresce isometricamente até a puberdade, fase em que ocorre uma rápida expansão dos ductos em meio ao tecido adiposo, com vários ciclos de proliferação a cada estro, preenchendo a glândula. A gravidez induz a formação do epitélio alveolar, com diferenciação dos alvéolos secretores de leite à metade da gestação (lactogênese I); a fase final da resulta em alvéolos prontos para a lactação (lactogênese II). A ejeção do leite mantém a lactação e, após o desmame, a glândula mamária sofre uma rápida onda de apoptose (involução), retornando ao estado de repouso. (B) Arquitetura celular da mama em glândulas mamárias nulíparas; com 6, 12 e 18 dias após a cópula (dpc); e 1 dia após o parto (dpp).

Os compartimentos epitelial e estromal da glândula mamária são derivados da ectoderme e mesoderme, respectivamente (MACIAS e HINCK, 2012). Em embriões de camundongos, o surgimento de cinco pares de placódios, a partir de cristas epidermais bilaterais, representa o início do desenvolvimento mamário (STERNLICHT, 2005). Histologicamente, os placódios consistem em aglomerados com várias camadas celulares, resultantes da migração e subsequente agregação de

células ectodérmicas que, anteriormente, haviam delimitado a “linha mamária” na superfície ventral do embrião. Em humanos, esta última se forma durante o primeiro trimestre da gestação e origina um par de placódios (MACIAS e HINCK, 2012).

Posteriormente, para formar os brotos mamários, os placódios invaginam no mesênquima subjacente, alcançando a porção adiposa – mais profunda. Em seguida, uma estrutura ductal rudimentar é formada devido à proliferação de um número limitado de ramos do primórdio mamário. A ramificação dicotômica da glândula mamária resulta em 10 a 15 ramos e há a formação do lúmen ductal e da estrutura mamilar. Após o nascimento, com a diminuição das influências maternas, essa estrutura entra em uma fase de quiescência morfogênica até a puberdade (FIGURA 3) (STERNLICHT, 2005; MACIAS e HINCK, 2012; OAKES, GALLEGU-ORTEGA e ORMANDY, 2014).

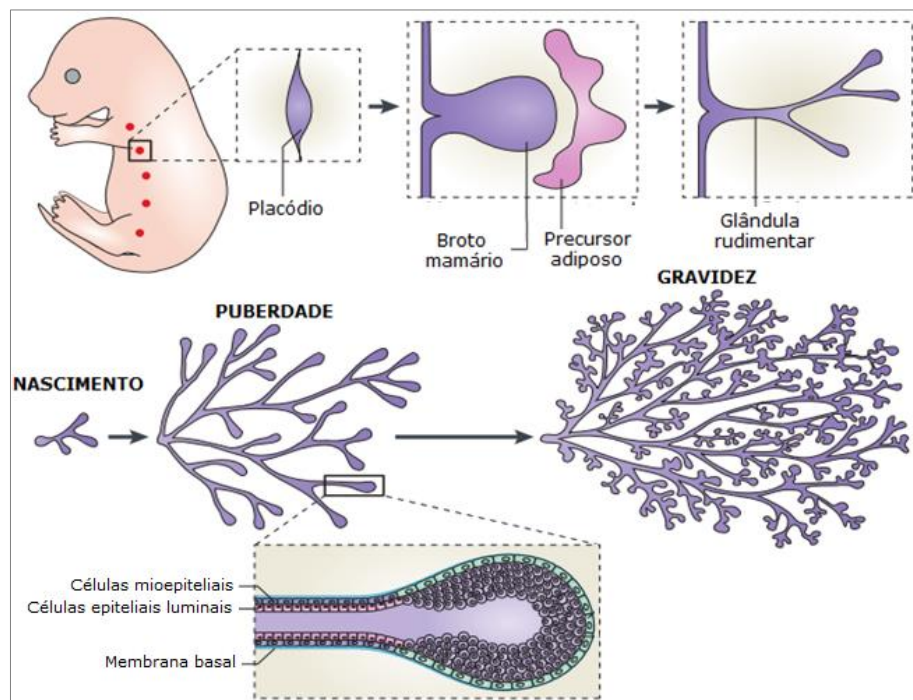


FIGURA 3 - ESQUEMA DA MORFOGÊNESE MAMÁRIA EM CAMUNDONGOS  
 FONTE: Adaptado de Gjorevski e Nelson (2011)

Segundo Howard e Gusterson (2000), o desenvolvimento mamário humano pouco difere do descrito acima. Em vez de uma ramificação única do broto mamário, em humanos há a formação de múltiplas “árvores mamárias” que se unem na altura do mamilo (MACIAS e HINCK, 2012). Além disso, a glândula mamária humana apresenta uma rede de ramificações de ductos que terminam em unidades lúbuloductais terminais (lóbulo), contrastando com roedores em que essas estruturas são

ausentes e há brotos alveolares que são formados a cada ciclo estro. Além disso, em roedores a glândula mamária apresenta menor quantidade de tecido conectivo fibroso, contendo mais adipócitos (VISVADER, 2009).

A partir da puberdade, ocorre um “mini-remodelamento” da glândula mamária feminina a cada ciclo menstrual, o qual não regride completamente ao final do ciclo (HASSIOTOU e GEDDES, 2012). Em resposta aos hormônios expressos durante a puberdade, incluindo o estrogênio e progesterona, os ductos primordiais proliferam e começam a infiltrar no estroma circundante (BOUDREAU, VAN'T VEER e BISSELL, 2012), expandindo substancialmente a população celular do tecido mamário. O estrogênio é o regulador crítico do desenvolvimento mamário puberal, sendo responsável pela promoção de crescimento celular dos componentes epitelial e estromal, atuando sobre a morfogênese ductal, em conjunto com o hormônio do crescimento (GH) e demais fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF1) (MACIAS e HINCK, 2012).

Nessa fase, a glândula mamária apresenta variações quantitativas de proliferação epitelial, com alongamento de ductos, dicotomização e ramificação lateral, além da formação de brotos mamários finais (FIGURA 4) e de unidades ducto-lobulares terminais, também denominadas brotos alveolares. Concomitante a este desenvolvimento, também ocorre uma extensiva expansão estromal (STERNLICHT, 2005; MACIAS e HINCK, 2012).

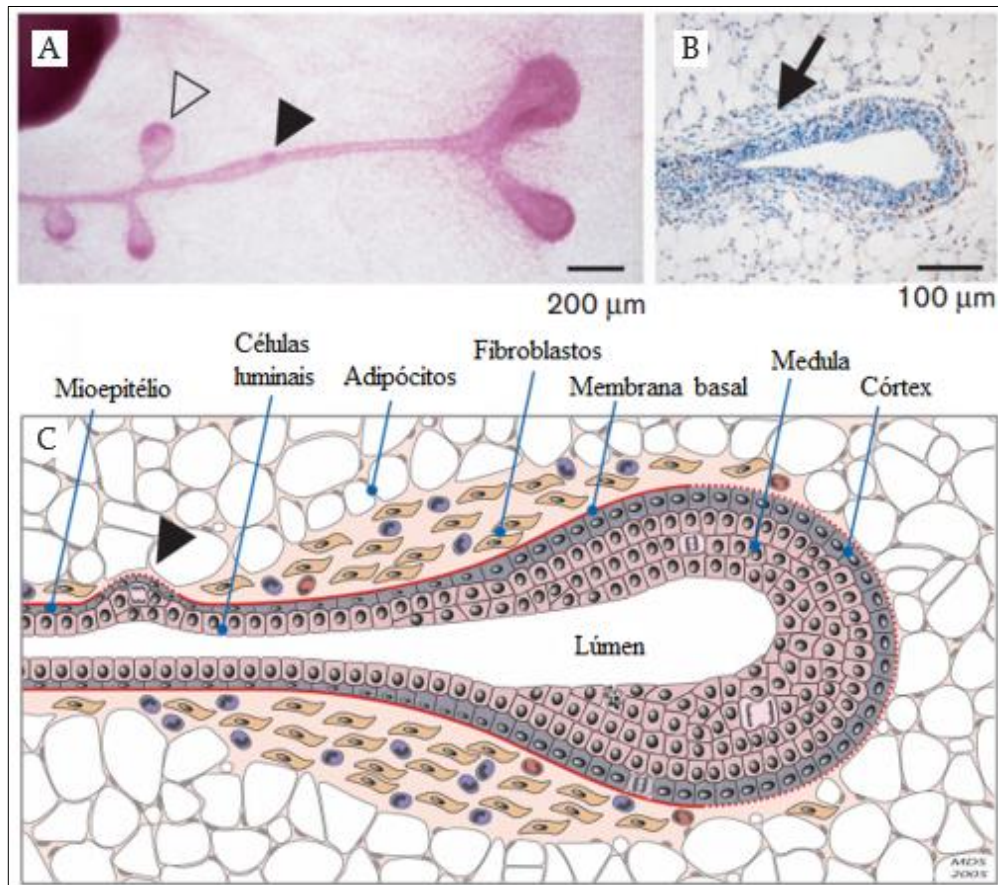


FIGURA 4 – MORFOLOGIA DOS DUCTOS MAMÁRIOS

FONTE: Adaptado de Sternlicht (2005)

NOTA: (A) Amplificação de um ducto primário de roedor, evidenciando a formação de dois novos ductos primários com brotos mamários finais independentes; três ramos laterais (ductos secundários) recentemente formados também estão presentes. (B) Imunofotomicrografia de um broto mamário final ilustrando a alta atividade proliferativa, conforme indicado pela grande quantidade de células em fase de replicação de DNA, as quais incorporaram bromodeoxiuridina (núcleo corado com marrom de diaminobenzidina). (C) Representação esquemática das características estruturais dos brotos mamários finais, incluindo componentes estromais.

Através de sucessivos ciclos de alongamento, bifurcação e ramificação lateral tem-se a formação de uma “árvore” epitélio-ductal, com estruturas lobulares, características do tecido mamário maduro (GJOREVSKI e NELSON, 2011).

O desenvolvimento mamário é contínuo a partir da adolescência e persiste até aproximadamente os 35 anos de idade. No entanto, as mudanças cíclicas da glândula ainda não resultam no remodelamento completo que é alcançado durante a gravidez/lactação. Nesta fase, ocorrem transformações gradativas que conferem maturidade funcional ao órgão (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

O preparo para a lactação requer numerosas mudanças na glândula mamária, incluindo a maturação desta e a morfogênese alveolar, ambas, primariamente, sob



regulação dos hormônios progesterona e prolactina. O primeiro é responsável pela ramificação extensiva do sistema ducto-lobular e pelo desenvolvimento dos alvéolos. Em conjunto com a prolactina, considerada como o principal indutor de competência lactacional, a progesterona também promove a diferenciação dos alvéolos para torná-los aptos a secretar leite durante a lactação (MACIAS e HINCK, 2012).

No ciclo de gravidez/lactação ocorre um remodelamento tecidual massivo, no qual a proliferação celular de MaSCs e progenitores celulares resulta no desenvolvimento de novos ductos, alongamento e extensa ramificação destes, fornecendo ramos ductais para uma segunda transformação, a formação e expansão dos alvéolos nos brotos terminais, processo denominado morfogênese alveolar. Este último consiste na diferenciação das células da camada luminal em lactócitos (OAKES, HILTON e ORMANDY, 2006; MACIAS e HINCK, 2012).

Durante a fase de gravidez/ lactação, também ocorrem mudanças em outros compartimentos da glândula, como o tecido adiposo, que perde seu conteúdo lipídico, em função da proliferação epitelial que ocupa os espaços interductais, e permanece como longas projeções dispersas no epitélio alveolar. A vascularização estromal, por sua vez, é ampliada com a finalidade de aumentar o aporte de energia, açúcares, aminoácidos e outros solutos requeridos para a produção de leite; além disso, cada alvéolo passa a conter uma rede de capilares adjacentes. Ao final da gravidez, as estruturas alveolares abrangem a maioria da camada de gordura da glândula e começam a apresentar atividade secretora (OAKES, HILTON e ORMANDY, 2006; MACIAS e HINCK, 2012).

Após a perda do estímulo de sucção do leite (desmame), cerca de 80% do epitélio mamário, cujo desenvolvimento foi induzido durante a gravidez, é removido por morte celular programada (apoptose), caracterizando a fase de involução pós-gestacional (OAKES, HILTON e ORMANDY, 2006; GJOREVSKI e NELSON, 2011). Apesar de retornar ao seu estado de repouso, a estrutura e a morfologia da glândula mamária não são mais idênticas àsquelas do estado de nuliparidade (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

Na involução, são reconhecidas duas fases: a primeira é reversível, uma vez que ainda retém o potencial de recomençar a lactação caso haja o restabelecimento do estímulo de sucção; e a segunda caracteriza a perda do suprimento de leite devido ao colapso dos alvéolos, sendo, portanto, irreversível (MACIAS e HINCK, 2012).

A primeira fase, cuja duração compreende aproximadamente 48 horas, é desencadeada pela estase do leite e por fatores locais. É caracterizada pela ativação da apoptose e regressão de ambos os tecidos, epitelial (secretor) e estromal, sendo que a arquitetura da glândula não é alterada. As células alveolares perdem a adesão à membrana basal e passam a se acumular no lúmen dos alvéolos. A subsequente transição para a segunda fase é dependente de fatores circulantes, como proteases serina e metaloproteinases de matriz (MMP). Ocorre uma segunda manifestação de apoptose, com a perda das células luminais, acompanhada por um intenso remodelamento estromal e rediferenciação dos adipócitos; uma vez que os alvéolos colapsam, os adipócitos começam a reabastecer a glândula. Em cerca de seis dias, há a remoção da maioria do epitélio secretor e sua subsequente substituição por adipócitos. O remodelamento do estroma é desencadeado por sinalização epitelial-estromal, em parte, através do estímulo para a expressão de fatores de remodelamento de matriz nos fibroblastos estromais (WATSON, 2006; HASSIOTOU e GEDDES, 2012, MACIAS e HINCK, 2012).

Após a menopausa também ocorre um processo de involução mamária. No entanto, este é desencadeado pela diminuição da função ovariana e a consequente diminuição dos níveis de hormônios esteroides sexuais, fatores que determinam a regressão e atrofia do tecido glandular bem como o aumento do tecido adiposo circundante. A redução do primeiro pode ser acima de um terço do volume original da mama, enquanto que a quantidade de tecido adiposo circundante pode variar entre as mulheres durante este período (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

## 2.2 O CÂNCER DE MAMA

### 2.2.1 Aspectos Epidemiológicos e Etiológicos

O termo “câncer” é utilizado para designar um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças comumente caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais com potencial invasivo, cuja origem é de natureza multifatorial (INCA/MS, 2014).



De acordo com as estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer [IARC – *International Agency for Research on Cancer* – Organização Mundial da Saúde (OMS)], o câncer de mama é a doença mais prevalente entre as mulheres (25,2%) e o que apresenta maior taxa de mortalidade (14,7%), sem considerar os casos de pele não melanoma.

Segundo Jemal e colaboradores (2011), a cada ano, mais de 1,3 milhões de mulheres no mundo são acometidas pela doença, sendo esta responsável por cerca de 14% das mortes relacionadas ao câncer. Quanto à sobrevida (em cinco anos), um aumento tem sido observado no decorrer dos últimos 40 anos para os países desenvolvidos. Atualmente, nestes, a sobrevida é de 85% enquanto que, para países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60% (INCA/MS, 2014).

A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2014, também válida para 2015, indica a ocorrência de cerca de 576 mil casos novos de câncer (incluindo os de pele não melanoma, de maior incidência), dos quais 57.120 são de mama. Para este, o risco estimado é de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2014). Segundo o projeto Globocan 2012, a previsão para o ano de 2020 indica incidência/mortalidade mundial de 1.985.272/ 622.568, sendo estimados 83.035/ 20.626 para o Brasil, respectivamente.

A neoplasia mamária é caracterizada como uma doença heterogênea em que fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, comportamentais e reprodutivos interagem de forma complexa para a carcinogênese (GALVÃO *et al.*, 2011).

O risco de desenvolver câncer de mama no sexo feminino está relacionado a fatores como: idade; histórico familiar positivo, incluindo alterações em genes de suscetibilidade à doença; história reprodutiva (menarca precoce, menopausa tardia, primeira gestação após os 30 anos de idade e nuliparidade); tempo de exposição hormonal, em particular ao estrogênio; e obesidade (OLDENBURG *et al.*, 2007, INCA/MS, 2014). Outros fatores relevantes, que podem influenciar o desenvolvimento da doença são a exposição à radiação ionizante e ao tabaco, o consumo regular de álcool (mesmo em quantidade moderada), o sedentarismo e uma dieta rica em gorduras.

Alguns fatores, entretanto, conferem proteção ao câncer de mama, como a gravidez, a amamentação por um longo período de tempo e a prática de atividades físicas (OLDENBURG *et al.*, 2007). Segundo o INCA/MS (2014), cerca de 30% dos

casos da doença podem ser evitados por medidas que incluem uma alimentação saudável, prática de atividade física regular e manutenção do peso ideal.

No que se refere ao caráter protetivo da gravidez, a depleção de MaSCs é de notável relevância, uma vez que essas populações celulares passam por diferenciação em função do aleitamento e diminuem sua propensão a alterações, já que constituem populações celulares suscetíveis a fatores que induzem mutação e/ou proliferação anormal (HASSIOTOU e GEDDES, 2012).

## 2.2.2 Classificação dos tumores de mama

Os carcinomas mamários apresentam ampla variação de fenótipos morfológicos e tipos histológicos que, por sua vez, conferem prognósticos e características clínicas particulares.

O termo “câncer de mama” compreende diversos tipos de tumores que são classificados conforme sua origem e características histológicas. A maioria é de origem epitelial, sendo denominados carcinomas, enquanto que aqueles derivados de tecidos conjuntivos, os sarcomas, são raramente observados na mama (HONDERMARCK, 2003).

Na maioria dos casos, a carcinogênese mamária é iniciada em células de revestimento dos ductos e lóbulos da glândula mamária, resultando em carcinomas ductais (CD) e lobulares (CL), respectivamente. Estes podem ser *in situ* (CDIS e CLIS) ou invasivo (CDI e CLI). Casos menos comuns incluem tumores mucinosos, inflamatórios, medulares, tubulares, papilares e filoides (GUIMARÃES, 2008).

Segundo a classificação de tumores de mama elaborada pela OMS (TAVASSOLI e DEVILEE, 2003), os carcinomas mamários invasivos são o tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres, compreendendo cerca de 22% de todos os cânceres no sexo feminino.

Entre os carcinomas invasivos, o CDI é o tipo histológico mais comum e compreende cerca de 80 a 90% do total de casos (INCA/MS, 2015). O diagnóstico para CDI é feito por exclusão, quando a lesão não se enquadra nos critérios diagnósticos para os tipos especiais de carcinomas mamários (lobular invasivo, tubular, cribiforme, metaplástico, apócrino, mucinoso, papilar, micropapilar, dentre outros), o que indica que não se trata de um grupo uniforme de carcinomas. Sendo

assim, a classificação de tumores de mama mais recente, de 2012, propôs a alteração na terminologia adotada. Tumores previamente conhecidos como CDI não especificado de outra forma (NOS – *not otherwise specified*) passam a se enquadrar em “carcinomas invasivos de tipo não especial” (NST – *no special type*). A definição do grupo proposto é idêntica àquela anteriormente estabelecida, exceto pelo fato de o termo “ductal” ter sido omitido da nova terminologia, uma vez que este pressupõe a histogênese dos tumores (derivação do sistema ductal) e não reflete a heterogeneidade do grupo. Entretanto, os termos CDI e ductal NOS ainda são aceitos como terminologia alternativa (SINN e KREIPE, 2013).

O estadiamento do câncer de mama tem por base o sistema TNM – Sistema de Classificação de Tumores Malignos –, que utiliza características anatômicas do tumor, determinadas clínica e histopatologicamente (quando possível). Três componentes são avaliados: T – o tamanho do tumor primário, N – a ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais e M – a ausência ou presença de metástase à distância (INCA/MS, 2004). Histologicamente os carcinomas mamários são classificados de acordo com parâmetros de diferenciação celular, formação do túbulo/glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas, cada um destes na escala: grau I – bem diferenciados, grau II – moderadamente diferenciados e grau III – indiferenciados.

Além da classificação tradicional, incluindo avaliação histológica e estadiamento clínico, vários estudos têm fornecido informações que permitem categorizar os subtipos do câncer de mama de acordo com o perfil molecular, fornecendo também assinaturas preditivas e de prognóstico que, potencialmente, podem individualizar a abordagem terapêutica (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003; REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

Quanto à classificação molecular, um estudo piloto, realizado por Perou e colaboradores (2000), evidenciou a heterogeneidade do câncer de mama com base em padrões diferenciais de expressão gênica. Os subtipos da doença são caracterizados por assinaturas moleculares distintas, as quais apresentam implicações frente a características biológicas, clínicas, resposta ao tratamento e sobrevida dos pacientes (LAM, JIMENEZ e BOVEN, 2014).

A análise de perfis de expressão gênica baseados em microarranjo resultou na distinção inicial de pelo menos quatro subtipos de câncer de mama relacionados com diferentes características moleculares do epitélio mamário, são eles: luminal/ RE<sup>+</sup>

(receptor de estrogênio positivo) – correspondente à linhagem luminal –; tipo basal – podendo incluir a linhagem mioepitelial –; HER2<sup>+</sup> (receptor de fator de crescimento epidermal 2 – também conhecido como ErbB2); e semelhante ao normal. Tais dados revelaram que os carcinomas mamários RE<sup>+</sup> e RE<sup>-</sup> são doenças fundamentalmente distintas em termos moleculares (PEROU *et al.*, 2000).

Análises posteriores permitiram a identificação de características diferenciais entre tumores classificados como subtipo luminal, resultando na distinção dos grupos luminal A [tumores de baixo grau, RP<sup>+</sup> (receptor de progesterona) e HER2<sup>-</sup>] e luminal B [tumores de grau elevado, RP<sup>+/-</sup>, HER2<sup>+/-</sup> e alto score para Ki-67 (antígeno marcador de proliferação celular) (CHEANG *et al.*, 2009). Para os subtipos luminais, há distinção na complexidade genômica, nas alterações genéticas-chave e no prognóstico, sendo que pacientes com tumores do tipo luminal A apresentam melhores taxas de sobrevida (VUONG *et al.*, 2014).

O subtipo basal é caracteristicamente um grupo de tumores heterogêneos, que apresentam diferentes histologias e expressão de marcadores de linhagem epitelial basal, enquanto tumores classificados como subtipo mama normal possuem elevada expressão de genes relacionados ao tecido adiposo e a células epiteliais basais e baixa expressão de genes característicos de células epiteliais luminais (VUONG *et al.*, 2014). No entanto, este subtipo é controverso, sendo questionado como suposto artefato de técnica ou contaminação em amostras de células normais, devido à baixa quantidade de células cancerosas que contém (SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003; VUONG *et al.*, 2014).

Posteriormente, estudos de perfil de expressão gênica baseados em assinatura de prognóstico, e de marcadores imunohistoquímicos possibilitaram delinear sete subtipos moleculares: luminal A, luminal B, tipo basal, HER2, semelhante ao normal, claudina baixa e molecular apócrino, cada qual apresentando status de RE, RP, HER2, citoqueratinas e marcadores do tipo basal distintos (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011). O subtipo claudina baixa é caracterizado, dentre outros aspectos, pela ausência ou baixa expressão de marcadores luminais, expressão elevada de marcadores relacionados ao processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM) e, geralmente, são tumores triplo-negativos, isto é, que não expressam RE, RP e HER2 (PRAT *et al.*, 2010). Já o grupo molecular apócrino apresenta RE<sup>-</sup>, RA<sup>+</sup> (receptor de andrógeno) – indicando que a sinalização decorrente de andrógenos é mais proeminente neste subtipo – e características apócrinas, como citoplasma

abundantemente eosinofílico e nucléolo proeminente, podendo apresentar superexpressão ou amplificação de HER2 (FARMER *et al.*, 2005).

Métodos complementares aos baseados em genômica podem fornecer dados relevantes para designar os subtipos da doença. Nesse contexto, destaca-se a importância das análises proteômicas na detecção de proteínas adicionais ou perfis proteicos que permitam o aprimoramento da classificação molecular do câncer de mama, bem como a identificação de potenciais biomarcadores que definam diferenças entre os subtipos no que se refere à resistência a terapias, ao prognóstico e à capacidade de metástase (LAM, JIMENEZ e BOVEN, 2014).

O estudo de Gonçalves e colaboradores (2008), por exemplo, identificou proteínas diferencialmente expressas entre os subtipos luminal e basal. Vinte e sete linhagens de carcinoma mamário foram analisadas e, através de dados integrados de proteômica e genômica, identificou-se a forma truncada da ubiquitina, que compreende uma modificação pós-traducional da ubiquitina, com expressão elevada no subtipo luminal e a proteína S100A9 (membro das proteínas S100, um importante grupo de marcadores do desenvolvimento e progressão do câncer) foi observada superexpressa no basal. Estes dados corroboram análises prévias, realizadas por Charafe-Jauffret e colaboradores (2006), nas quais técnicas de microarranjo de DNA e imunohistoquímica apresentaram resultados similares. Neste mesmo estudo foi estabelecida uma “assinatura” com dez proteínas distinguindo acuradamente carcinomas mamários luminais e basais.

Além deste, diversos estudos comparativos têm sido realizados para elucidar o proteoma dos principais subtipos de câncer de mama e elencar proteínas candidatas a marcadoras moleculares dos mesmos (LAM, JIMENEZ e BOVEN, 2014).

### 2.2.3 A tumorigênese mamária

O câncer de mama compreende uma doença complexa causada pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, responsáveis por determinar a progressão de células normais, através de estágios hiperplásicos e displásicos, em um câncer invasivo e, finalmente, em uma doença metastática (GARNIS *et al.*, 2004). Este processo ocorre por alterações em proteínas de múltiplas vias que, em conjunto, conduzem à proliferação, diferenciação ou inibem a apoptose, conferindo

“imortalidade” às células anormais. Cada um desses processos celulares é regulado por redes complexas de proteínas com múltiplas interconexões de atividade. Teoricamente, uma proteína anormal que tenha função-chave nestas redes pode interferir no fluxo de informações à jusante (CALVO *et al.*, 2005; SOMIARI *et al.*, 2005).

Hanahan e Weinberg (2000) sugerem que uma série de alterações fisiológicas na célula conduz ao fenótipo maligno, incluindo redução da dependência de promotores de crescimento exógenos e concomitante resistência a fatores inibitórios de crescimento, suscetibilidade reduzida a apoptose, capacidade de multiplicação indefinida (imortalidade) e de angiogênese, bem como potencialidade invasiva e metastática. Com o progresso conceitual da última década, duas outras potenciais condições têm sido propostas no desenvolvimento do câncer: a reprogramação do metabolismo energético e o não reconhecimento pelo sistema imune (FIGURA 5); os tumores ainda exibem outra dimensão de complexidade por conter um repertório de células normais que configuram o “microambiente do tumor”, e este, por sua vez, contribui para a aquisição de tais alterações (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

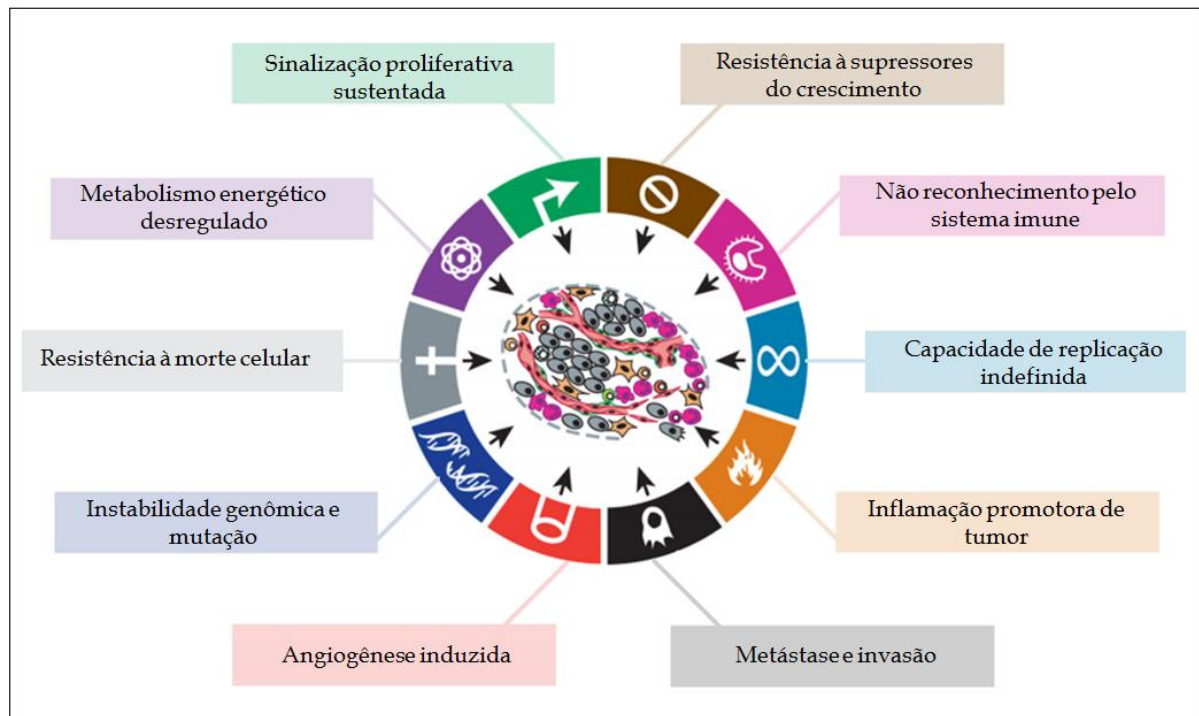


FIGURA 5 – HABILIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS CANCEROSAS  
FONTE: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011)

Em geral, a carcinogênese mamária é iniciada em células de revestimento dos ductos e lóbulos (GUIMARÃES, 2008). O modelo mais comum para o desenvolvimento do carcinoma mamário propõe que um tumor invasivo se origina nas unidades lóbulo-ductais terminais e progride através de estágios de doença benigna da mama, adquirindo mais alterações celulares, com excessiva proliferação e atipia (CICHON *et al.*, 2010).

Inicialmente, o epitélio torna-se altamente proliferativo (hiperplasia), mas sem atipia citológica, contendo poucas alterações genéticas. As hiperplasias avançam a um estado de atipia celular, que pode se manifestar em ductos ou lóbulos, e ainda progredir a carcinoma *in situ* (CIS). O estágio de CIS apresenta atipia mais evidente e um aumento significativo da atividade mitótica epitelial e das alterações genéticas. O processo progride a carcinoma localmente invasivo, no qual a membrana basal é rompida e as células epiteliais invadem o estroma circundante, com possibilidade de metástase para vários órgãos, como pulmões, ossos e fígado (FIGURA 6) (TLSTY *et al.*, 2004; POLYAK, 2007; CICHON *et al.*, 2010).

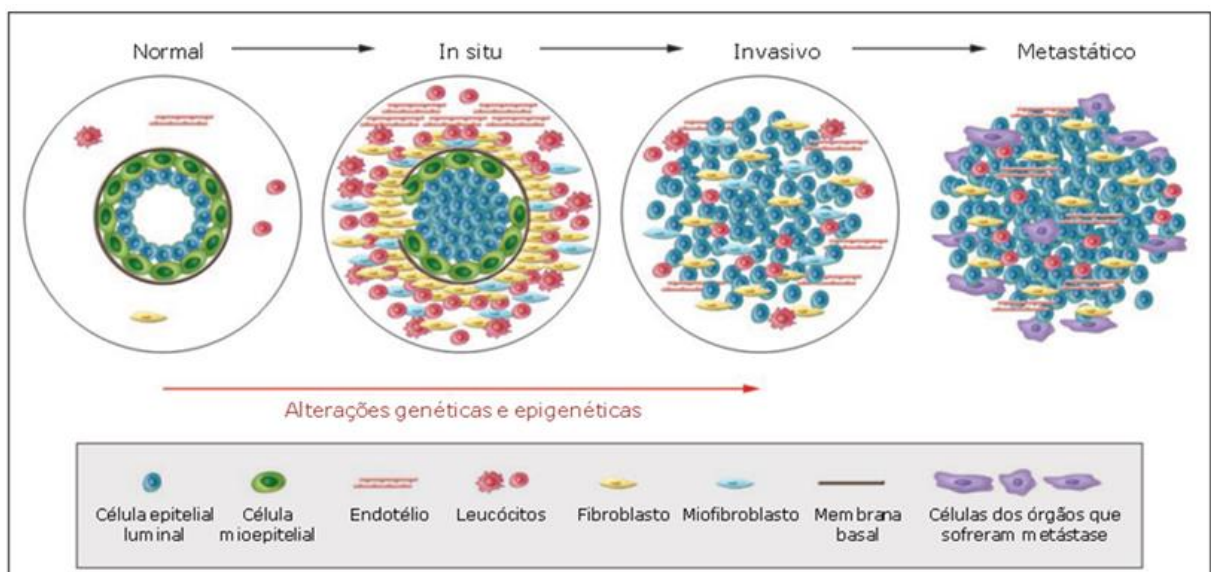


FIGURA 6 – MODELO HIPOTÉTICO DE PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: Adaptado de Polyak (2007)

NOTA: Esquema ilustrando um corte transversal do ducto mamário normal e neoplásico (*in situ*, invasivo e metastático). Os ductos mamários normais são compostos por uma camada de células epiteliais e mioepiteliais e possuem uma membrana basal íntegra; o estroma circundante apresenta vários leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Carcinomas *in situ* apresentam um número menor de células mioepiteliais e, concomitantemente, aumento na quantidade de tipos celulares estromais. A perda das células mioepiteliais e o rompimento da membrana basal resulta em carcinomas invasivos, cujas células podem invadir tecidos adjacentes e migrar para locais distantes do tumor primário (metástase).



As alterações morfológicas e estruturais que ocorrem no compartimento epitelial são acompanhadas por mudanças na função das células que compõem o estroma. Cichon e colaboradores (2010) evidenciam a importância do microambiente na tumorigênese mamária e elencam alterações estromais que podem ser críticas para a progressão da doença, como a perda da função das células mioepiteliais em manter estruturada a membrana basal e a ativação de fibroblastos, que passam a produzir proteases e estas, por sua vez, degradam MEC, culminando no caráter invasivo da doença. A figura 7 representa algumas das alterações que ocorrem no microambiente em que o tumor se desenvolve.

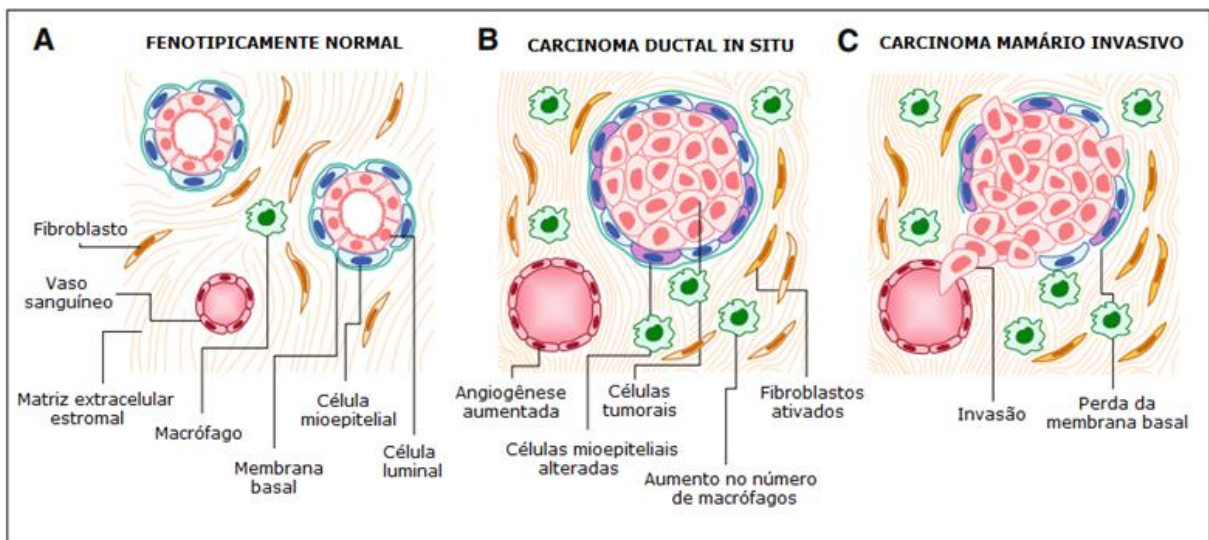


FIGURA 7 – ALTERAÇÕES EPITELIAIS E ESTROMAIS NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO

FONTE: Adaptado de Cichon *et al.* (2010)

NOTA: Representação esquemática (A) do tecido mamário fenotipicamente normal, com as estruturas epiteliais consistindo em células luminais centrais rodeadas por células mioepiteliais, incluídas em uma membrana basal contínua, enquanto o estroma contém fibroblastos, células imunes e vasculatura; (B) progressão a carcinoma *in situ*, caracterizado pelo epitélio proliferativo contido em uma membrana basal ainda íntegra, e aumento nas populações celulares estromais e na angiogênese; (C) o carcinoma invasivo é definido pelo rompimento da membrana basal e pela perda de células mioepiteliais, com a consequente invasão das células epiteliais no estroma e na circulação.

A disseminação do tumor envolve múltiplos passos, incluindo invasão localizada, intravasação das células cancerosas na circulação sistêmica, transporte para outros órgãos, extravasação de células cancerosas individuais nos órgãos-alvo, formação de micrometástases, com expansão e, consequente, colonização das células cancerosas nos sítios secundários (FIGURA 8) (KENIFIC, THORBURN e DEBNATH, 2011).

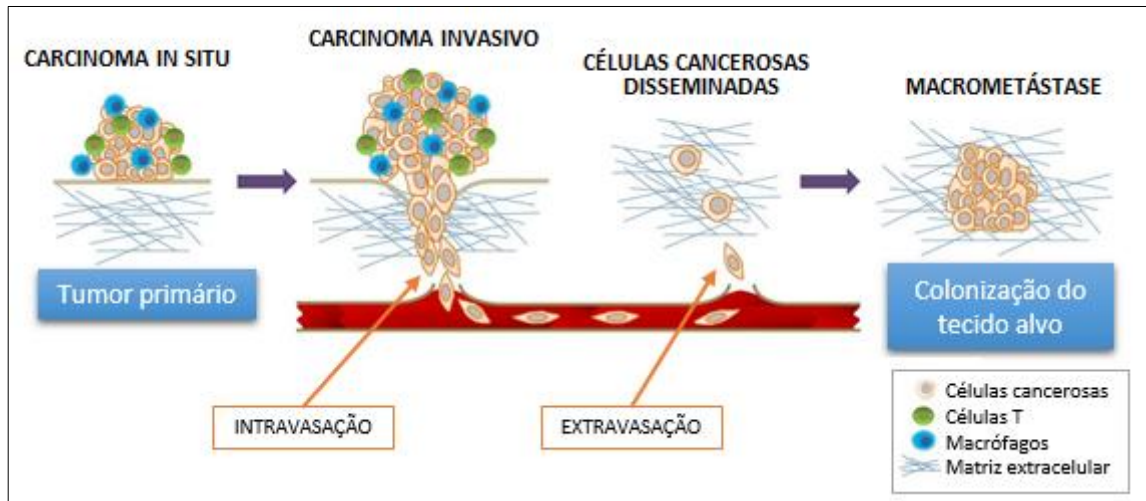


FIGURA 8 - ETAPAS DA PROGRESSÃO METASTÁTICA DE UM TUMOR  
 FONTE: Adaptado de Kenific, Thorburn e Debnath (2011)

Para que as células cancerosas adquiram a capacidade metastática, diversas alterações morfológicas são induzidas em decorrência de mudanças no perfil de expressão gênica. As células epiteliais passam a expressar marcadores moleculares característicos de células mesenquimais (vimentina, N-caderina, fibronectina e integrina  $\alpha V\beta 6$ ), assumindo fenótipo mesenquimal – aquisição de propriedades típicas de fibroblastos, redução da adesão celular, perda da polaridade e aumento da motilidade –, com capacidade de invadir tecidos adjacentes; este processo é denominado transição epitelial-mesenquimal (TEM) e consiste em um mecanismo natural do desenvolvimento embrionário, sendo reutilizado por células cancerosas no decorrer da progressão do tumor (CREIGHTON, GIBBONS e KURIE, 2013).

O processo reverso, a transição mesenquimal-epitelial (TME) é necessário para que as células cancerosas em disseminação possam colonizar um órgão-alvo, readquirindo o fenótipo epitelial, através da expressão de seus marcadores característicos (E-caderina, desmoplaquina, citoqueratinas e ocludina). Sendo assim, a TEM possui papel crítico na transformação inicial de tumores benignos em cânceres, enquanto a TME atua em estágios tardios da metástase, sendo ambas reconhecidas como eventos essenciais para a disseminação de tumores (YAO, DAI e PENG, 2011).

## 2.3 PROTEÔMICA

### 2.3.1 O método proteômico

O advento da proteômica está relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e suas consequências no metabolismo celular (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

Apesar do potencial para codificar todas as proteínas de uma célula/tecido, o genoma não é suficientemente informativo em relação a muitas propriedades proteicas [localização celular, expressão, padrão de interações, atividade, modificações pós-traducionais (MPTs), etc.], que correspondem às variáveis moduladas durante respostas biológicas e mecanismos regulatórios. Em alguns casos, o nível de transcritos também não permite identificar essas propriedades de forma satisfatória. Portanto, análises genômicas e transcriptômicas, isoladamente, não são capazes de fornecer informações cruciais sobre expressão e interação proteicas, representativas de fenótipos celulares e mecanismos moleculares (AHMAD e LAMOND, 2014).

Sendo assim, no cenário pós-genômico, a abordagem proteômica se consolida como um método fundamental para avaliar a expressão de novas proteínas, novas modificações pós-traducionais, e novas redes de interação proteica (HONDERMARCK *et al.*, 2008). A integração de vários métodos pode prover informações relevantes sobre o desenvolvimento/manutenção da homeostase tecidual bem como de patologias relacionadas a este.

A abordagem proteômica consiste no estudo proteoma, compreendendo aspectos como identificação e ontologia de proteínas, interações proteicas, envolvimento em vias bioquímicas, quantificação e análise funcional das mesmas (LAM, JIMENEZ e BOVEN, 2014).

O proteoma consiste no conjunto de proteínas expresso pelo genoma sob determinadas condições fisiológicas e, por estar em constante fluxo em função de diversos fatores, reflete o estado atual de funcionamento do sistema (WILKINS *et al.*, 1996).

As MPTs, o *splicing* alternativo de mRNAs precursores e a clivagem e processamento de cadeias polipeptídicas contribuem para geração de múltiplas

isoformas de proteína, com funções distintas ou sobrepostas (HAN, ASLANIAN e YATES, 2008; AHMAD e LAMOND, 2014), e que conferem um nível adicional de complexidade ao proteoma das células. Além disso, a natureza dinâmica do proteoma pode ser evidenciada pelo fato de uma mesma cadeia polipeptídica formar conjuntos de proteínas distintos, regulados de forma independente, o que pode refletir em funcionalidades e localização diferenciais (AHMAD e LAMOND, 2014).

As análises proteômicas englobam uma série de métodos de separação de proteínas. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), primeiramente descrita por O'Farrell e Klose em 1975, resulta na separação das proteínas em função de dois parâmetros físico-químicos: a primeira dimensão é baseada no ponto isoelétrico (pI) intrínseco através da isoeletrofocalização (IEF) e, na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares pela eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). O resultado é um mapa bidimensional das proteínas produzidas por uma célula/ tecido com *spots* dispersos, cada um correspondendo a uma proteína em particular.

Através do método 2D-PAGE, um grande contingente de proteínas (3.000 a 10.000) pode ser separado visualmente, inclusive aquelas muito ácidas/básicas (QIN e LING, 2012). Também é possível detectar e, paralelamente, quantificar grandes e complexas misturas de proteínas bem como identificar isoformas de proteínas e MPTs (GAO, 2014).

As análises proteômicas são diferenciadas pelo emprego ou não da espectrometria de massa (MS – *Mass Spectrometry*) na identificação das proteínas. Estudos que não são baseados em MS requerem o conhecimento prévio das proteínas em análise, uma vez que são empregados métodos que utilizam anticorpos, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) e outras técnicas, incluindo imunohistoquímica (IHC), *Western blotting* e microarranjos de tecido (TMA – *tissue microarray*) e de proteína (PMA – *protein microarray*) (GALVÃO *et al.*, 2011).

Já abordagens que empregam MS não necessitam de conhecimento prévio das proteínas em estudo. Trata-se de uma das técnicas mais utilizadas para a identificação de proteínas desconhecidas. O espectrômetro de massa (MS) é um instrumento analítico que permite mensurar a razão massa/carga ( $m/z$ ) de íons em fase gasosa. Uma fonte de ionização permite a conversão de moléculas neutras em íons gasosos, estes são separados em função de sua razão massa/carga por um analisador de massa e o tempo de vôo dos peptídeos ionizados bem como o número

de íons para cada valor  $m/z$  são registrados por um ou mais detectores. De acordo com a fonte de ionização, as técnicas mais utilizadas são MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) (FIGURA 9), SELDI-TOF MS (*Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), e ESI MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) (HAN, ASLANIAN e YATES, 2008; GALVÃO *et al.*, 2011). Para as duas primeiras, TOF se refere ao tipo de analisador de massa empregado.

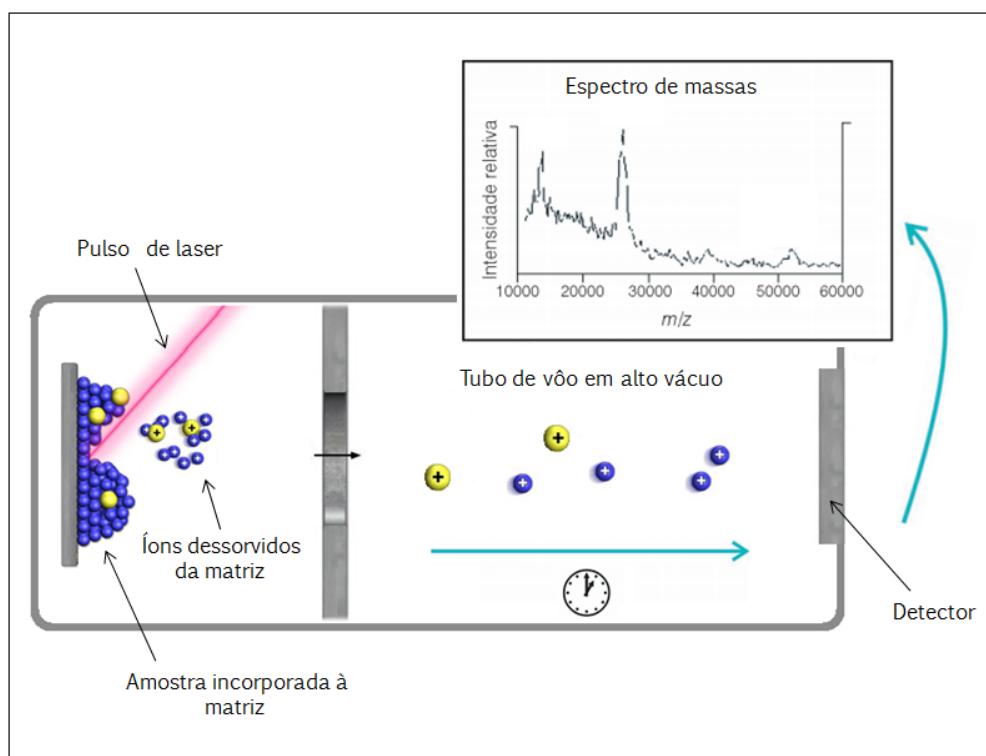


FIGURA 9 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO DE MASSA COM DESSORÇÃO/ IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VÔO (MALDI-TOF)

FONTE: Adaptado de Colnago *et al.* (2015)

NOTA: Os peptídeos são cristalizados em uma matriz sólida e sobre esta incide um pulso de laser que ioniza os fragmentos. Os peptídeos ionizados são separados por TOF e, posteriormente, detectados. O tempo para percorrer o tubo de vôo depende da razão massa/carga dos íons, sendo as partículas com menor valor detectadas primeiro. O espectro de massas obtido constitui o PMF (*peptide mass fingerprint*) da amostra (*spot*) e pode ser comparado com dados pré-existentes em bancos de dados genômicos.

O espectrômetro de massa MALDI-TOF é extremamente sensível, permitindo a detecção de componentes químicos e biológicos abaixo de fentomols ( $<10^{-15}$  mol) e pode tolerar concentrações elevadas de sal, eliminando a necessidade de adotar processos de dessalinização (CHO *et al.*, 2013).

A informação obtida na análise, isto é, o espectro de peptídeos pode ser submetido em bancos de dados para a comparação da massa molar dos fragmentos de peptídeos – *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) – com a massa dos peptídeos derivados de digestão teórica (*in silico*) de proteínas, permitindo a identificação das proteínas em estudo (GALVÃO *et al.*, 2011). Além da técnica por PMF, a espectrometria em tandem (MS/MS) também pode ser utilizada e fornece informações referentes à sequência de aminoácidos do peptídeo/proteína e a análise de MPTs. Esta técnica consiste em uma segunda fragmentação dos peptídeos, visando a obtenção de sua sequência que, posteriormente, pode ser confrontada com bancos de dados para a identificação (HAN, ASLANIAN e YATES, 2008; GALVÃO *et al.*, 2011).

### 2.3.2 A proteômica e o câncer de mama

Uma das principais aplicações da proteômica é identificar biomarcadores relacionados a doenças, através da super ou subexpressão de determinados peptídeos ou proteínas, podendo auxiliar na distinção entre os estados saudável e patológico, para diagnóstico inicial e determinação da progressão da patologia (BAKRY *et al.*, 2011).

Biomarcadores são definidos como alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou genéticas pelas quais processos biológicos simples, normais ou anormais podem ser reconhecidos ou monitorados (SRIVASTAVA e GOPAL-SRIVASTAVA, 2002). Mutações gênicas, alterações na transcrição e tradução, bem como proteínas, frequentemente de baixo peso molecular secretadas na corrente sanguínea, podem potencialmente ser utilizadas como biomarcadores específicos de doenças (WULFKUHLE, 2003; BAKRY *et al.*, 2011).

No caso de doenças complexas, como a tumorigênese mamária, biomarcadores únicos podem não ser informativos. Abordagens de *screening* global, como microarranjo de DNA e técnicas de proteômica, têm permitido a comparação de padrões de expressão gênica e proteica de tecidos tumorais e não tumorais possibilitando à identificação de “assinaturas” moleculares com valor preditivo e prognóstico (McGEE *et al.*, 2006).

Diversos estudos utilizando metodologias proteômicas têm apresentado uma grande quantidade de informações referentes ao perfil proteico de tecidos específicos, além de dados sobre expressão diferencial entre tumor e tecido sadio, bem como entre diferentes tipos de carcinoma. O câncer de mama tem sido objeto de muitos desses estudos e, aliando métodos de separação e identificação proteica às técnicas de validação, muitas proteínas envolvidas na carcinogênese mamária já foram determinadas (SAUTER *et al.*, 2002; COLETTA *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2006; PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006; TOILLON *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; CANCEMI *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

O estudo de Pucci-Minafra e colaboradores (2006), por exemplo, apresenta uma proposta diferenciada de interpretação, indicando a categorização das proteínas de acordo com suas propriedades funcionais. Neste estudo, 162 proteínas (incluindo isoformas e variantes) foram identificadas em um protótipo de mapa proteômico de uma linhagem de células mamárias neoplásicas (8701-BC). As classes funcionais para estas proteínas foram delineadas com base em critérios de afinidade entre suas principais funções biológicas, sendo elas: (1) proteínas de citoesqueleto e associadas; (2) enzimas metabólicas; (3) chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*; (4) proteínas associadas à membrana, com múltiplas atividades; (5) proteínas ligantes de cálcio; (6) proteínas com funções ligantes; (7) biossíntese de proteínas; (8) biossíntese de nucleotídeos; (9) reguladores do crescimento e proliferação celular; (10) degradação proteica; (11) detoxificação e proteínas redox; (12) proteínas com atividade extracelular e (13) fragmentos de proteínas. No entanto, os autores ressaltam que, devido ao fato de muitas proteínas serem multifuncionais, a atribuição dentro de um único grupo funcional está sujeita a futuras revisões. A abordagem de gerar perfis proteômicos distintos tendo por base as categorias funcionais é sugerida pelo fato de contribuir para a detecção de biomarcadores e por oferecer novas descobertas em relação à biologia molecular do câncer (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007).

A relevância do estudo comparativo das proteínas expressas por tecidos sadios e cancerosos é evidenciada pela necessidade de se desenvolver métodos diagnósticos mais eficazes e, em contrapartida, menos invasivos. A mamografia e o exame físico são comumente utilizados para a detecção de alterações morfológicas na mama. No entanto, para que um tumor atinja tamanho suficiente para se tornar perceptível, o processo de carcinogênese já se encontra em estágios avançados, o

que pode resultar na disseminação de células cancerosas antes mesmo da detecção do tumor primário. Além disso, para o diagnóstico preciso, é necessária a realização de procedimentos invasivos, como a biópsia, para encaminhamento do material biológico ao patologista.

Nesse contexto, Sauter e colaboradores (2002) enfatizam a importância de estudos que disponibilizem métodos alternativos de diagnóstico e evidenciam a análise do conteúdo proteico do fluido do aspirado de mamilo (NAF – *Nipple Aspirate Fluid*) como uma fonte relevante de informações sobre a mama, por conter proteínas específicas da glândula, geralmente mais concentradas do que os níveis sanguíneos. Neste estudo, a análise das proteínas expressas no NAF de mulheres saudáveis e de portadoras de carcinoma mamário indicou cinco proteínas com diferença de expressão, dentre as quais os picos 6,5 kDa 15,94 kDa foram os mais sensíveis, sugerindo que a presença destas pode ser utilizada para a predição do câncer de mama.

A análise proteômica de tecido mamário não tumoral da mama com o tumor, realizada por Costa e colaboradores (2011), revelou informações sobre proteínas expressas pela mama em estado sadio, sendo estas incluídas em classes funcionais conforme o catálogo proposto por Pucci-Minafra e colaboradores (2006), acima descrito. Os dados também demonstraram a importância das MPTs na biologia da glândula mamária bem como proteínas descritas como diferencialmente expressas em relação ao tumor. As alterações na expressão de proteínas específicas sugerem a importância da caracterização do tecido não tumoral, uma vez que muitos dos processos necessários para o desenvolvimento mamário são recapitulados na tumorigênese, especialmente na cascata metastática (COLETTA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2011).

O estabelecimento do perfil proteico do tecido mamário não tumoral é fundamental para caracterizar a mama em estado saudável e possibilitar a inferência de alterações envolvidas na transformação e progressão neoplásica. Análises referentes à expressão gênica e proteica de tecidos sadios podem contribuir para determinar um perfil básico desse tecido e a mama contralateral àquela acometida pelo carcinoma pode representar uma amostra com potencial para que este propósito seja alcançado.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o proteoma de amostras de tecido mamário não tumoral contralateral e comparar os resultados obtidos com o tecido do tumor da mesma paciente, avaliando possíveis alterações relacionadas ao processo de tumorigênese.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as proteínas expressas pelo tecido não tumoral contralateral no contexto de suas funções biológicas;
- Comparar as proteínas expressas pelo tecido mamário não tumoral contralateral e pelo tumor, para detectar proteínas diferencialmente expressas;
- Avaliar as possíveis alterações proteicas mais frequentemente envolvidas na tumorigênese mamária, conforme dados já descritos na literatura;
- Gerar informações sobre o proteoma do tecido não tumoral contralateral e do tumor para compor o banco de dados de estudos proteômicos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR);
- Comparar os resultados com dados de proteômica já obtidos pelo LabCHO.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas oito amostras de tecido mamário não tumoral contralateral (NTC) de diferentes pacientes, sendo que de três delas obteve-se amostras do tumor primário (T), permitindo uma análise comparativa para a mesma paciente. Informações clínicas e imunohistoquímicas estão apresentadas no quadro 1. A média de idade das pacientes foi de  $51,5 \pm 9,8$  anos.

CÓDIGO	IDADE	TIPO HISTOLÓGICO	GRAU	RE	RP	ErbB2	Ki67
P1	59	CDI	II	POS	NEG	NEG (+1)	30-40%
P2	40	CDI	III	SI	SI	SI	SI
P3	65	CDI	I	SI	SI	SI	SI
P4	50	CDI	II	POS	POS	NEG (+1)	30%
P5	63	CDI	III	POS	POS	(+2)*	10%
P6	44	CDI	II	POS	POS	(+2)*	25%
P7	41	CDI	II/III	NEG	NEG	NEG (0)	50%
P8	50	CDI	I	POS	POS	NEG (+1)	40%

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: **CDI** – Carcinoma Ductal Invasivo; **RE** – Receptor de Estrogênio; **RP** - Receptor de Progesterona; **ErbB2** - receptor de fator de crescimento epidermal 2 (também denominado HER2); **Ki67** – antígeno marcador de proliferação celular; **SI** – sem informação.

\* Encaminhado para confirmação por FISH.

As amostras foram obtidas de pacientes portadoras de câncer de mama ductal invasivo, diagnosticadas em diferentes estágios clínicos, provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. A coleta foi realizada durante o procedimento de retirada do tumor e de reconstrução estética, na intervenção cirúrgica. O tecido não tumoral foi retirado da mama oposta àquela acometida pelo câncer. O material biológico foi armazenado em tubos devidamente identificados e encaminhado ao LabCHO.

O presente estudo pertence a um amplo projeto de pesquisa na área de genética dos tumores mamários, que vem sendo desenvolvido pelo LabCHO e pelo

Serviço de Mastologia do Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, PR). As pacientes foram informadas sobre a sua inclusão no projeto através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado por Comitê de Ética (CONEP 7220).

## 4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O processamento do material foi realizado no fluxo laminar para a remoção de resquícios de vasos sanguíneos e gordura, descartados posteriormente. As amostras foram dispostas sobre Placas de Petri e fragmentadas com o auxílio de pinças e tesouras estéreis, sendo estocadas a -80°C para futura extração das proteínas.

## 4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A extração consiste na solubilização, desnaturação e redução de proteínas que, sob a ação dos reagentes da solução de lise, terão suas interações intra- e intermoleculares rompidas, resultando em um extrato contendo proteínas solubilizadas.

Para a obtenção dos extratos proteicos foram utilizadas quantidades entre 0,2g e 0,4g de amostra, acrescidos de 700µL e 1000µL de Tampão de Lise (7M de ureia, 2M de tiourea, 40mM de tris, 40mM de DTT e 4% de CHAPS), respectivamente, e 2µL de inibidor de protease (PMSF), conforme adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). A homogeneização foi realizada com um triturador elétrico. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por cinco minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, para a obtenção do sobrenadante contendo as proteínas.

Os extratos obtidos foram submetidos à sonicação em banho de gelo por cinco a sete ciclos de cinco segundos, com intervalo de um minuto para evitar o aquecimento do material e o comprometimento do conteúdo proteico.

A mensuração da concentração proteica foi realizada através da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), indicada para a detecção e identificação de proteínas solubilizadas. A proteína albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine* – BSA) foi

utilizada na confecção da curva-padrão. Esta etapa resulta na determinação do volume de amostra a ser aplicado para a confecção dos géis bidimensionais.

#### 4.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

##### 4.4.1 Primeira dimensão

Esta etapa é realizada para separar as proteínas em função de seus pontos isoelétricos (pI), sendo este o valor de pH no qual a soma de todas as cargas parciais da proteína é igual a zero (carga total nula).

Tiras que possuem um gel com gradiente de pH imobilizado (IPG - *immobilized pH gel*), compreendendo a faixa de 4 a 7 (130x3x0,5 mm; GE Healthcare) foram utilizadas no presente estudo. Previamente ao procedimento de separação das proteínas, foi necessário efetuar a reidratação destas.

Nesta primeira fase, realizada em um suporte de acrílico com 12 canaletas (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*/ Amersham Biosciences), as tiras foram posicionadas de forma que a superfície do gel permanecesse em contato com 1000µg de amostra acrescidos de solução de reidratação, contendo 7M de ureia, 2M de tiureia, 2% de CHAPS, 0,5% de IPG, 50mM de DTT e traços de azul de bromofenol (adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* – GE Healthcare, 2004). Em seguida, as tiras de IPG foram cobertas com 2ml de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*/ GE Healthcare) para evitar que a ureia cristalizasse e as tiras desidratassem, limitando também o risco de contaminação das amostras. O período de reidratação foi de 18 horas, em temperatura ambiente.

A isoeletrofocalização foi realizada no sistema de eletroforese *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare), com o programa específico para a tira de 13 cm, pH 4-7 (QUADRO 2), sendo utilizada uma placa de cerâmica com 12 canaletas (*Manifold*/ GE Healthcare) para o posicionamento das tiras de IPG, que, novamente, foram cobertas com *DryStrip Cover Fluid*. Após este procedimento, as tiras de IPG foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

Fase	Voltagem (V)	Tempo	kV/h
1	500	1:00h	0,5
2	1000	1:00h	0,8
3	8000	2:30h	11,3
4	8000	0:30h	4,1
Total	-	5:00h	16,7

QUADRO 2 - PROGRAMA PARA O ETTAN IPGPHOR II (TIRA DE 13CM; PH 4-7)  
 FONTE: GE HEALTHCARE HANDBOOK, *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (2004)

#### 4.4.2 Segunda Dimensão

##### 4.4.2.1 Equilíbrio das Tiras de IPG

Este procedimento foi realizado em duas etapas de 30 minutos cada para, em seguida, efetuar a segunda dimensão. O primeiro equilíbrio consistiu em manter as tiras de IPG em contato com 5ml de tampão de equilíbrio (50mM de Tris-HCl – pH 8,8, 6M de ureia, 30% de glicerol, 2% de SDS e traços de azul de bromofenol) acrescido de 100mg de DTT (agente redutor), adaptado de *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare, 2004). No segundo, o mesmo procedimento foi realizado com 5ml de tampão de equilíbrio e 400mg de iodacetamida, prevenindo a reoxidação das proteínas durante a eletroforese, o que poderia resultar em traços e artefatos no gel.

##### 4.4.2.2 Preparação do Gel 2D e Corrida Eletroforética SDS-PAGE

Nesta etapa as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular (MM). O resultado final consiste em um gel com diversos *spots* dispersos conforme seu pI e MM, que correspondem a proteínas particulares.

Para a corrida 2D, foi utilizado um gel de poliacrilamida a 10% com dimensões de 18 cm x 16 cm (água ultra-pura, 30% de mix de acrilamida/ bis-acrilamida, 1,5M Tris – pH 8,8, 10% de SDS, 10% de persulfato de amônio e 0,04% de TEMED), em um volume final de 40ml. As tiras de IPG foram posicionadas horizontalmente sobre o gel SDS-PAGE 10%, com adição de agarose (0,5%) para selar a tira. A corrida 2D foi realizada na cuba de eletroforese *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare) sob temperatura ajustada (11°C) e com o programa para corrida de 15mA/ gel nos 30 minutos iniciais e o restante da corrida a 30mA/ gel. A interrupção da corrida se deu quando a linha de migração atingiu um cm do limite inferior do gel 2D.

#### 4.4.2.3 Fixação das proteínas e coloração do gel 2D

Após a corrida, o gel 2D foi fixado em solução contendo 1,3% de ácido ortofosfórico (85%) e 20% de metanol por uma hora.

Para a coloração dos géis foi utilizado Coomassie coloidal (G-250) por 18 horas e a posterior descoloração com água destilada, realizada até que se obtivesse um gel límpido e com nitidez na marcação dos *spots*.

### 4.5 DIGITALIZAÇÃO DO GEL 2D E ANÁLISE DAS IMAGENS

A digitalização dos géis 2D foi realizada no equipamento *ImageScanner™ II* (GE Healthcare) e a análise das imagens pelo software *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare).

### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL 2D

#### 4.6.1 Excisão e digestão dos *spots* de interesse

Os *spots* de interesse foram manualmente removidos do gel com o auxílio de ponteiros novas estéreis (1000µL) e descorados em 400µL de solução 50% acetonitrila e 25mM bicarbonato de amônio, por uma hora. O procedimento foi repetido

até a completa descoloração. Em seguida, os *spots* foram submetidos a duas etapas de desidratação em 200µL de acetonitrila 100%, por cinco minutos cada, sendo esta posteriormente descartada, permitindo a secagem dos *spots*.

Após, foi realizado um tratamento com solução 1mM de DTT e 25mM de bicarbonato de amônio, por 45 minutos a 56°C, seguido de desidratação com acetonitrila. Subsequentemente, os *spots* foram alquilados com solução 55mM de iodoacetamida e 25mM de bicarbonato de amônio, por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz, sendo desidratadas com acetonitrila ao término (cf. SOUZA, 2012).

Para a digestão proteolítica *in gel*, os *spots* foram reidratados em 20µL de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin* – Promega) – 15ng/L em tampão contendo 40mM bicarbonato de amônio e 10% acetonitrila – durante 30 minutos em banho de gelo. A digestão foi realizada a 37°C por 16 a 20 horas.

Em seguida, os *spots* foram submetidos a um tratamento com 20µL de solução 50% acetonitrila e 5% ácido trifluoroacético (TFA) e mantidos sob agitação por 30 minutos; este procedimento foi realizado por duas vezes para promover a extração dos peptídeos do gel. A secagem dos *spots* foi realizada no concentrador rotativo à vácuo, até que a solução contendo os peptídeos fosse reduzida a 10-5µL. Os *spots* que secaram completamente foram ressuspensos em 4µL de TFA 0,1%.

Para a espectrometria de massa, a solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução 50% acetonitrila: 0,1% ácido trifluoroacético (TFA), saturada com matriz de HCCA (ácido  $\alpha$ -iano-4-hidroxicinamínico). O volume final de 1µL foi aplicado em placa para MALDI (*scout MTP MALDI ion source 384 target* - Bruker Daltonics).

Para alguns *spots* foi necessário realizar a purificação dos peptídeos mediante emprego de ponteiras com coluna de fase reversa “*Zip Tip Pipette Tips*” (MILLIPORE). O procedimento adotado incluiu a pré-umidificação da ponteira, por duas vezes, em solução 50% acetonitrila e 0,1% TFA e o equilíbrio das mesmas em TFA 0,1%, duas vezes. Em seguida, a amostra foi aspirada e ressuspensa várias vezes, para permitir a ligação dos peptídeos na resina C-18. Posteriormente, por duas vezes a ponteira foi lavada em TFA 0,1% e, então, os peptídeos foram eluídos da coluna com 50% acetonitrila e 0,1% TFA. A etapa seguinte consistiu na aplicação da amostra na placa para MALDI, em igual proporção com HCCA.

#### 4.6.2 Análise dos espectros de massas

As massas dos peptídeos tripticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF/MS/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). Tal técnica é baseada na desorção e ionização das proteínas com *laser*, auxiliado por uma matriz (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) que avalia o conteúdo através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (TOF – *Time Of Flight*).

Os dados da fragmentação de peptídeos foram obtidos através do programa *FlexControl 3.0* (Bruker Daltonics), com amplitude de massa molecular de 700 a 3200 Da e mínimo de 200 disparos de *laser* por espectro. A calibração interna foi realizada utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (ACTH 1-17, ACTH 1-24, ACTH 18-39, angiotensina I, angiotensina II e somatostatina). A análise e tratamento dos espectros MS foi realizada com o programa *FlexAnalysis 2.0* (Bruker Daltonics).

#### 4.6.3 Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas a partir do padrão de massas obtido (PMF – *peptide mass fingerprinting*), utilizando a plataforma MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) associada ao banco de dados *Swiss-Prot*.

Os parâmetros de busca foram: enzima tripsina; um sítio de clivagem perdido; *Homo sapiens (human)*; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa; e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância de erro máxima foi de 100 ppm (partes por milhão).

Os critérios utilizados para a identificação proteica incluem:

- MASCOT score de probabilidade: é o valor atribuído à identificação pelo programa de busca. O valor mínimo a partir do qual a identificação deixa de ser considerada aleatória, varia de acordo com a taxonomia da amostra. Para a busca por proteínas humanas, utilizando o banco de dados *Swiss-Prot* e a plataforma MASCOT, esse valor é 56. Quanto maior o score, maior a confiabilidade na identificação;



- Percentual da cobertura de sequência: este valor indica o quanto da sequência de aminoácidos da proteína sugerida foi coberto pelos peptídeos resultantes da digestão trípica da amostra. Foram considerados satisfatórios valores acima de 20%;

- Número de peptídeos sobrepostos: corresponde aos picos de massa obtidos por espectrometria de massa (MS) e que foram pareados com as massas teóricas, contidas no banco de dados da plataforma. A quantidade mínima de massas peptídicas pareadas considerada satisfatória foi quatro.

- Dados de MM e PI esperados: valores teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico.

Os nomes e siglas utilizados para as proteínas foram os indicados no banco de dados *Expasy - UniProtKB/ Swiss-Prot* (<http://www.uniprot.org>). Os respectivos genes são representados pelas siglas oficiais de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

## 5 RESULTADOS

A caracterização do proteoma do tecido mamário não tumoral contralateral (NTC) foi realizada com oito amostras de diferentes pacientes com carcinoma ductal invasor. Para três destas, também foi possível analisar as proteínas expressas pelo tumor (T), em função da disponibilidade do referido material biológico.

Os géis foram confeccionados com 1000µg de proteína. Para todas as amostras foi possível obter triplicatas, entretanto, a inviabilidade da utilização de um gel da amostra P8 NTC resultou na análise em duplicatas para esta paciente. Um total de 31 géis foram analisados através do programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare), conforme descrito em Material e Métodos.

O número de *spots* detectado em cada replicata e os valores médios para cada amostra estão descritos na TABELA 1.

TABELA 1 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS (continua)

Amostra	Gel 2D	Nº de <i>spots</i> detectados	Nº médio de <i>spots</i>
P1 NTC	1	578	569
	2	533	
	3*	596	
P2 NTC	1	996	807,7
	2*	952	
	3	475	
P3 NTC	1*	739	646,3
	2	590	
	3	610	
P4 NTC	1	566	557
	2	514	
	3*	591	
P5 NTC	1*	628	626,7
	2	645	
	3	607	
P6 NTC	1*	729	691,3
	2	624	
	3	721	

TABELA 2 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS (conclusão)

Amostra	Gel 2D	Nº de <i>spots</i> detectados	Nº médio de <i>spots</i>
<b>P7 NTC</b>	1*	617	626,3
	2	601	
	3	661	
<b>P8 NTC</b>	1*	619	616
	2	613	
<b>P4 T</b>	1*	642	598,7
	2	601	
	3	553	
<b>P7 T</b>	1	620	705,3
	2	762	
	3*	734	
<b>P8 T</b>	1	755	761
	2*	767	

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: **NTC** – Tecido não tumoral contralateral; **T** – tumor.

NOTA: 1, 2 e 3 – replicatas dos géis 2D; \* - gel de referência para a amostra.

As replicatas foram comparadas e sobrepostas pelo programa (*matching*), resultando na detecção dos *matches* para cada *spot* e na definição de um gel de referência para cada amostra, com base na representatividade e resolução dos *spots*.

Após, para cada análise – proteoma do tecido NTC e comparação entre os tecidos NTC e T –, foi determinado o gel mais representativo da população amostral (*master*), sendo este utilizado como base para o *matching* entre os géis de referência de cada tecido. O gel *master* é utilizado como base para calcular, através do programa, o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM) experimental para as proteínas identificadas.

O gel 2D P5 NTC I foi definido como o *master* para o tecido NTC (FIGURA 10) e para a análise comparativa foram considerados os géis *master* P4 NTC III e P4 T I (FIGURA 11).

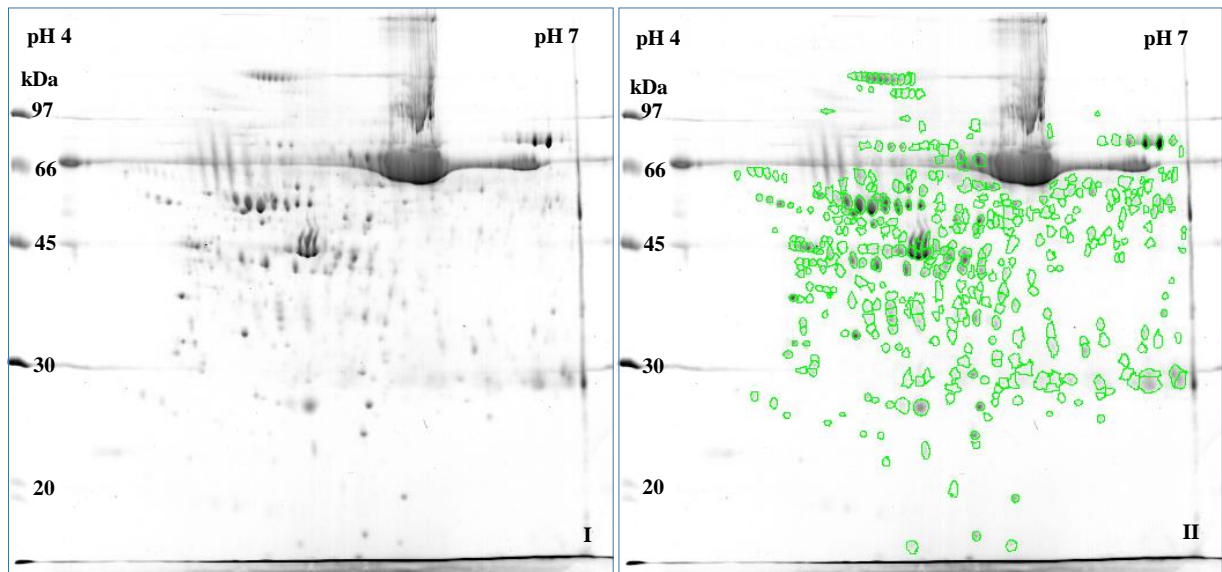


FIGURA 10 – GEL BIDIMENSIONAL *MASTER* DO TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: Gel 2D da paciente P5.

NOTA: I – Imagem capturada com ajuste de contraste. II – *Spots* detectados e pareados (*matches*) com os demais géis 2D estão destacados em verde.

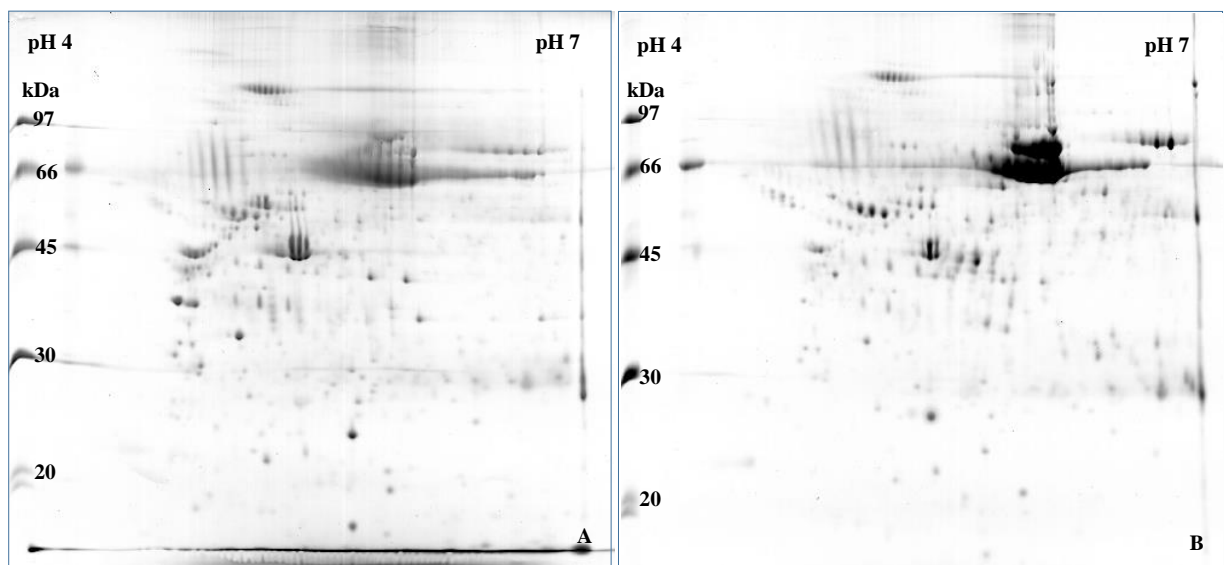


FIGURA 11 – GÉIS BIDIMENSIONAIS *MASTERS* DA COMPARAÇÃO ENTRE TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E RESPECTIVO TUMOR PRIMÁRIO

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: Géis 2D da paciente P4.

NOTA: **A** – Tecido não tumoral contralateral; **B** – Tumor primário; Imagens capturadas com ajuste de contraste.

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL

Presentes em pelo menos três amostras, 388 *spots* foram considerados no estudo. Destes, 110 obtiveram identificação de acordo com os parâmetros adotados, correspondendo a 62 proteínas diferentes. A albumina (ALBU) foi identificada em 30 *spots* e não foi incluída entre as proteínas identificadas. Vinte e uma proteínas (33,9%) estavam representadas em mais de um *spot*, sugerindo a ocorrência de modificações pós-traducionais (MPT), uma vez que estas são responsáveis por alterar a MM e o pI (MAYR *et al.*, 2005).

A figura 12 apresenta o gel *master* com os *spots* identificados em destaque e os dados referentes aos critérios para a identificação das proteínas estão descritos na tabela 2.



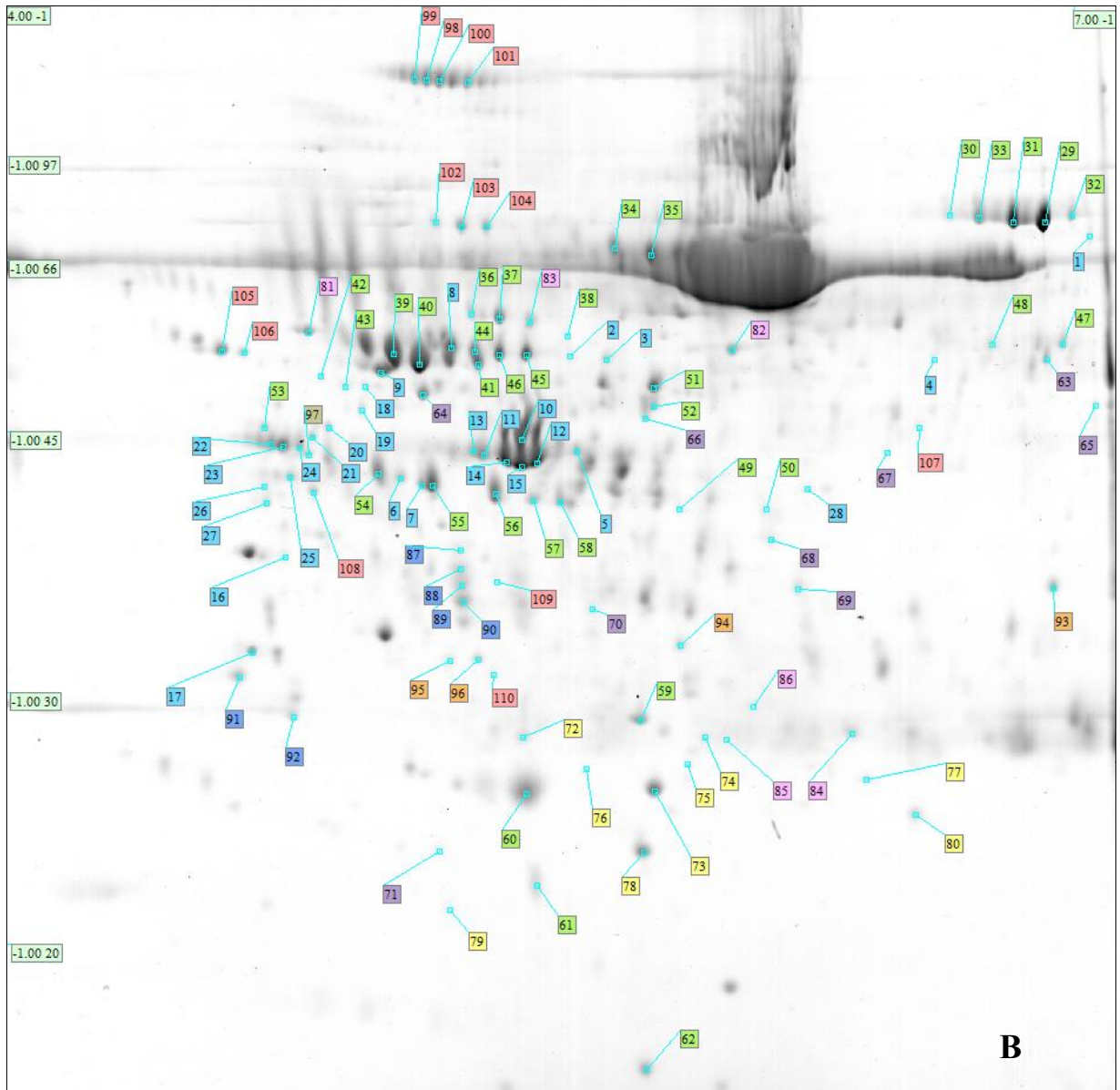


FIGURA 12 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL (conclusão)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: (B) Os *spots* destacados indicam as 110 identificações. As cores representam as diferentes classes funcionais: azul claro – citoesqueleto e proteínas associadas; verde – proteínas com função de ligação/transporte; roxo – enzimas metabólicas; amarelo – proteínas redox e de detoxificação; rosa – chaperonas moleculares e proteínas *heat shock*; azul escuro – reguladores da proliferação e do crescimento celular; laranja – proteínas associadas à membrana; marrom – biossíntese de proteínas; vermelho – proteínas com outras funções.

TABELA 3 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (continua)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
<b>CITOESQUELETO E PROTEÍNAS ASSOCIADAS</b>									
Queratina do citoesqueleto tipo I - 14 (K1C14)	P02533	1	71/48	51,872 / 5,09	74,000 / 6,98	42,66% / 1,89	18%	11/44	100
Queratina do citoesqueleto tipo II – 7 (K2C7)	P08729	2	72/50	51,411 / 5,40	54,000 / 5,55	5,03% / 0,15	18%	07/17	50
		3	122/45	51,411 / 5,40	54,000 / 5,65	5,03% / 0,25	29%	12/25	100
Queratina do citoesqueleto tipo I - 10 (K1C10)	P13645	4	68/38	59,020 / 5,13	54,000 / 6,55	8,51% / 1,42	20%	05/10	50
Queratina do citoesqueleto tipo I - 18 (K1C18)	P05783	5	111/48	48,029 / 5,34	44,000 / 5,57	8,39% / 0,23	30%	10/27	50
Queratina do citoesqueleto tipo I - 19 (K1C19)	P08727	6	77/38	44,079 / 5,04	42,000 / 5,09	4,72% / 0,05	27%	08/28	100
		7	282/52	44,079 / 5,04	42,000 / 5,14	4,72% / 0,10	60%	25/42	50
Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A)	Q71U36	8*	112/34	50,788 / 4,94	55,000 / 5,22	8,29% / 0,28	31%	12/26	50
Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B)	P68363			50,804 / 4,94		8,26% / 0,28			
Tubulina cadeia beta-5 (TBB5)	P07437	9	141/75	50,095 / 4,78	52,000 / 5,03	3,80% / 0,25	38%	13/30	50
Actina citoplasmática 1 (ACTB) Actina citoplasmática 2 (ACTG)	P60709 P63261	10*	93/45	42,052 / 5,29 42,108 / 5,31	45,000 / 5,42 44,000 / 5,31	7,01% / 0,13 6,87% / 0,11	36%	11/39	100
		11*	90/32	42,052 / 5,29 42,108 / 5,31		4,63% / 0,02 4,60% / 0,00	29%	09/22	100
		12*	88/37	42,052 / 5,29 42,108 / 5,31		4,63% / 0,17 4,60% / 0,15	25%	08/36	100
Actina aórtica do músculo liso (ACTA)	P62736	13*	86/46	42,381 / 5,23	44,000 / 5,29	3,82% / 0,06	26%	08/16	100
Actina do músculo cardíaco alfa-1 (ACTC)	P68032			42,334 / 5,23		3,93% / 0,06			
Actina do músculo liso gama-entérica (ACTH)	P63267	14	77/45	42,249 / 5,31	44,000 / 5,37	4,14% / 0,06	23%	07/48	50
Actina citoplasmática 2 (ACTG)	P63261	15	111/53	42,108 / 5,31	43,000 / 5,42	2,12% / 0,11	43%	12/33	50
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	P09493	16	61/46	32,746 / 4,69	37,000 / 4,77	12,99% / 0,08	23%	08/33	150
Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4)	P67936	17	84/45	28,619 / 4,67	32,000 / 4,68	11,81% / 0,01	22%	06/20	100



TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (continuação)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
Vimentina (VIME)	P08670	18	107/34	53,676 / 5,06	51,000 / 4,99	4,99% / 0,07	26%	11/24	50
		19	117/32	53,676 / 5,06	48,000 / 4,98	10,57% / 0,08	22%	10/14	100
		20	239/33	53,676 / 5,06	46,000 / 4,89	14,30% / 0,17	50%	25/41	100
		21	140/44	53,676 / 5,06	45,000 / 4,84	16,16% / 0,22	30%	15/26	50
		22	110/36	53,676 / 5,06	45,000 / 4,73	16,16% / 0,33	21%	08/11	50
		23	113/32	53,676 / 5,06	44,000 / 4,76	18,03% / 0,3	29%	15/31	50
		24	188/38	53,676 / 5,06	44,000 / 4,81	18,03% / 0,25	39%	17/26	50
		25	98/36	53,676 / 5,06	42,000 / 4,78	21,75% / 0,28	24%	10/21	100
		26	105/30	53,676 / 5,06	42,000 / 4,71	21,75% / 0,35	25%	11/22	50
		27	70/31	53,676 / 5,06	41,000 / 4,71	23,61% / 0,35	19%	08/20	100
Proteína reguladora de actina (CAPG)	P40121	28	66/40	38,760 / 5,82	41,000 / 6,20	5,78% / 0,38	20%	06/16	150
<b>PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO / TRANSPORTE</b>									
Sorotransferrina (TRFE)	P02787	29	182/33	79,294 / 6,81	78,000 / 6,85	1,63% / 0,04	25%	16/22	50
		30	194/32	79,294 / 6,81	80,000 / 6,59	0,89% / 0,22	24%	16/20	50
		31	172/47	79,294 / 6,81	79,000 / 6,77	0,37% / 0,04	25%	17/26	50
		32	180/39	79,294 / 6,81	80,000 / 6,93	0,89% / 0,12	21%	16/19	100
		33	71/35	79,294 / 6,81	79,000/ 6,68	0,37% / 0,13	12%	7/10	100
Hemopexina (HEMO)	P02790	34	64/43	52,385 / 6,55	72,000 / 5,67	37,44% / 0,88	24%	07/40	100
		35	72/24	52,385 / 6,55	70,000 / 5,77	33,63% / 0,78	18%	10/35	100

TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (continuação)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
Antitrombina III (ANT3)	P01008	36	114/27	53,025 / 6,32	60,000 / 5,28	13,15% / 1,04	23%	15/33	100
		37	100/35	53,025 / 6,32	59,000 / 5,36	11,27% / 0,96	25%	10/19	50
		38	76/33	53,025 / 6,32	57,000 / 5,54	7,50% / 0,78	18%	07/10	100
Alfa-1- antitripsina (A1AT)	P01009	39	171/52	46,878 / 5,37	55,000 / 5,07	17,33% / 0,3	42%	15/30	50
		40	159/33	46,878 / 5,37	53,000 / 5,14	13,06% / 0,23	44%	14/33	50
		41	126/29	46,878 / 5,37	53,000 / 5,30	13,06% / 0,07	29%	11/20	50
		42	128/55	46,878 / 5,37	52,000 / 4,87	10,93% / 0,5	33%	10/24	50
		43	111/52	46,878 / 5,37	50,000 / 4,93	6,66% / 0,44	31%	09/20	100
Proteína de ligação à vitamina D (VTDB)	P02774	44	103/36	54,526 / 5,40	55,000 / 5,29	0,87% / 0,11	30%	08/17	50
		45	117/30	54,526 / 5,40	54,000 / 5,43	0,96% / 0,03	31%	09/16	100
		46	109/27	54,526 / 5,40	54,000 / 5,36	0,96% / 0,04	31%	08/20	50
Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB)	P02675	47	137/44	56,577 / 8,54	56,000 / 6,91	1,02% / 1,63	34%	16/29	100
		48	142/32	56,577 / 8,54	56,000 / 6,71	1,02% / 1,83	36%	19/36	100
		49	122/46	56,577 / 8,54	40,000 / 5,85	29,30% / 2,69	33%	20/41	100
		50	75/33	56,577 / 8,54	40,000 / 6,08	29,30% / 2,46	20%	07/14	100
Cadeia gama do fibrinogênio (FIBG)	P02679	51	88/31	52,106 / 5,37	51,000 / 5,78	2,12% / 0,41	18%	07/11	100
		52	106/41	52,106 / 5,37	48,000 / 5,78	7,88% / 0,41	31%	09/21	50
Inibidor de ribonuclease (RINI)	P13489	53	167/40	51,766 / 4,71	46,000 / 4,71	11,14% / 0,00	39%	12/15	100
Haptoglobina (HPT)	P00738	54	104/30	45,861 / 6,13	43,000 / 5,02	6,24% / 1,11	22%	09/18	100

TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (continuação)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
Haptoglobina (HPT)	P00738	55	100/39	45,861 / 6,13	42,000 / 5,17	1,88% / 0,96	13%	06/06	100
		56	132/42	45,861 / 6,13	41,000 / 5,34	10,60% / 0,79	28%	12/19	100
		57	115/42	45,861 / 6,13	41,000 / 5,45	10,60% / 0,68	21%	08/11	100
		58	96/54	45,861 / 6,13	41,000 / 5,52	10,60% / 0,61	22%	10/19	100
Componente amilóide P do soro (SAMP)	P02743	59	89/43	25,485 / 6,10	29,000 / 5,74	13,79% / 0,36	23%	05/06	100
Apolipoproteína A-I (APOA1)	P02647	60	158/37	30,759 / 5,56	26,000 / 5,43	15,47% / 0,13	48%	16/41	100
Proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4)	P02753	61	72/32	23,337 / 5,76	22,000 / 5,46	1,51% / 0,3	30%	04/05	100
Transtirretina (TTHY)	P02766	62	91/25	15,991 / 5,52	17,000 / 5,76	6,31% / 0,24	63%	05/09	100
<b>ENZIMAS METABÓLICAS</b>									
Aldeído desidrogenase citosólica (AL1A1)	P00352	63	110/44	55,454 / 6,30	54,000 / 6,86	2,62% / 0,56	24%	09/20	100
ATP sintase subunidade beta (ATPB)	P06576	64	164/35	56,525 / 5,26	50,000 / 5,15	11,54% / 0,11	37%	19/30	100
Enolase-alfa (ENOA)	P06733	65	69/33	47,481 / 7,01	47,00 / 6,89	1,01% / 0,12	18%	06/11	50
Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QRC1)	P31930	66	92/33	53,297 / 5,94	47,000 / 5,76	11,81% / 0,18	25%	08/15	50
Adenosilhomocisteinase (SAHH)	P23526	67	78/23	48,255 / 5,92	44,000 / 6,43	8,82% / 0,51	16%	08/22	100
Glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática NAD <sup>+</sup> (GPDA)	P21695	68	208/33	38,171 / 5,81	38,000 / 6,10	0,45% / 0,29	56%	19/37	100
		69	155/44	38,171 / 5,81	36,000 / 6,18	5,69% / 0,37	32%	12/32	100
Pirofosfatase inorgânica (YPIR)	Q15181	70	113/33	33,095 / 5,54	34,000 / 5,61	2,73% / 0,07	35%	08/16	50
Lactoilglutaciona liase (LGUL)	Q04760	71	64/38	20,992 / 5,12	24,000 / 5,19	14,33% / 0,07	22%	05/07	100

TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (continuação)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
<b>PROTEÍNAS REDOX E DE DETOXIFICAÇÃO</b>									
Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3)	P21266	72	76/45	26,998 / 5,37	28,000 / 5,42	3,71% / 0,05	31%	07/15	100
Glutathione S-transferase P (GSTP1)	P09211	73	105/37	23,569 / 5,43	26,000 / 5,78	10,31% / 0,35	54%	08/24	50
Peroxirredoxina-4 (PRDX4)	Q13162	74	100/37	30,749 / 5,86	28,000 / 5,92	8,94% / 0,06	50%	05/10	50
Peroxirredoxina-6 (PRDX6)	P30041	75	60/39	25,133 / 6,00	27,000 / 5,88	8,07% / 0,12	28%	04/10	50
		76	99/29	25,133 / 6,00	27,000 / 5,60	7,43% / 0,4	32%	06/09	50
Peroxirredoxina 3 (PRDX3)	P30048	77**	47	20,017 / 7,67	26,000 / 6,37	7,20% / 1,3	14%	03/05	100
Peroxirredoxina 2 (PRDX2)	P32119	78	130/33	22,049 / 5,66	24,000 / 5,75	8,85% / 0,09	39%	08/17	100
		79	70/36	22,049 / 5,66	22,000 / 5,22	0,22% / 0,44	30%	05/18	50
Proteína DJ-1 (PARK7)	Q99497	80	85/32	20,050 / 6,33	25,000 / 6,50	24,69% / 0,17	50%	05/10	50
<b>CHAPERONAS MOLECULARES E PROTEÍNAS <i>HEAT SHOCK</i></b>									
Proteína dissulfeto isomerase A1 (PDIA1)	P07237	81	148/42	57,480 / 4,76	57,000 / 4,83	0,83% / 0,07	25%	10/12	50
Proteína dissulfeto isomerase A3 (PDIA3)	P30101	82	145/53	57,146 / 5,98	55,000 / 6,00	3,75% / 0,02	36%	14/26	100
Proteína <i>heat shock</i> de 60kDa mitocondrial (HSP60)	P10809	83	153/40	61,187 / 5,70	59,000 / 5,44	3,57% / 0,26	33%	15/32	100
Proteína <i>heat shock</i> de 27 kDa (HSPB1)	P04792	84	112/26	22,826 / 5,98	28,000 / 6,33	22,67% / 0,35	40%	08/27	50
		85	72/38	22,826 / 5,98	28,000 / 5,98	22,67% / 0,00	27%	05/12	100
Proteína do retículo endoplasmático 29 (ERP29)	P30040	86	58/47	29,032 / 6,77	30,000 / 6,05	3,33% / 0,72	23%	05/15	100
<b>REGULADORES DA PROLIFERAÇÃO E DO CRESCIMENTO CELULAR</b>									
Mimecan (MIME)	P20774	87	73/28	34,243 / 5,46	38,000 / 5,24	10,97% / 0,22	26%	05/12	100

TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (continuação)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	ΔMM/ ΔpI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
Mimecan (MIME)	P20774	88	105/38	34,243 / 5,46	37,000 / 5,25	8,05% / 0,21	26%	07/10	100
		89	129/39	34,243 / 5,46	36,000 / 5,25	5,13% / 0,21	35%	08/12	100
		90	74/45	34,243 / 5,46	35,000 / 5,25	2,21% / 0,21	28%	06/16	100
Proteína 14-3-3 épsilon (1433E)	P62258	91	101/50	29,326 / 4,63	31,000 / 4,64	5,71% / 0,01	40%	09/21	100
Proteína 14-3-3 beta/alfa (1433B)	P31946	92	95/45	28,179 / 4,76	29,000 / 4,79	2,91% / 0,03	43%	10/29	50
PROTEÍNAS ASSOCIADAS À MEMBRANA									
Anexina A1 (ANXA1)	P04083	93	86/38	38,918 / 6,57	36,000 / 6,88	7,50% / 0,31	34%	07/17	100
Anexina A3 (ANXA3)	P12429	94	113/36	36,524 / 5,63	33,000 / 5,85	9,65% / 0,22	29%	08/12	100
Proteína de canal de cloreto intracelular tipo I (CLIC1)	O00299	95	67/24	27,248 / 5,09	32,000 / 5,22	17,44% / 0,13	27%	06/30	100
		96	122/34	27,248 / 5,09	32,000 / 5,30	17,44% / 0,21	49%	08/24	100
BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS									
Proteína ribossomal 40S (RSSA)	P08865	97	82/34	32,947 / 4,79	44,000 / 4,83	33,55% / 0,04	29%	05/07	100
OUTRAS FUNÇÕES									
Colágeno VI cadeia alfa-1 (CO6A1)	P12109	98	70/41	109,602 / 5,26	129,000 / 5,16	17,70% / 0,10	17%	13/42	100
		99	108/48	109,602 / 5,26	129,000 / 5,12	17,70% / 0,14	20%	17/38	100
		100	110/51	109,602 / 5,26	128,000 / 5,19	16,79% / 0,07	21%	18/42	100
		101	85/37	109,602 / 5,26	127,000 / 5,27	15,86% / 0,01	16%	12/31	100
Glicoproteína alfa-1B (A1BG)	P04217	102	66/36	54,790 / 5,56	78,000 / 5,18	42,36% / 0,38	21%	07/30	100
		103	110/49	54,790 / 5,56	77,000 / 5,25	40,54% / 0,31	26%	10/29	50

TABELA 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO (conclusão)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Identificação no gel	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
Glicoproteína alfa-1B (A1BG)	P04217	104	88/33	54,790 / 5,56	77,000 / 5,32	40,54% / 0,24	22%	07/12	100
Glicoproteína alfa-2HS (FETUA)	P02765	105	78/41	40,098 / 5,43	55,000 / 4,59	37,16% / 0,84	22%	07/14	50
		106	58/23	40,098 / 5,43	55,000 / 4,65	37,16% / 0,78	15%	07/19	100
Inibidores de dissociação Rab/GDP beta (GDIB)	P50395	107	68/34	51,087 / 6,11	46,000 / 6,51	9,96% / 0,4	19%	06/14	100
Complemento C3 (CO3)	P01024	108	98/42	188,569 / 6,02	41,000 / 4,84	78,26% / 1,18	10%	13/17	100
Glicoproteína 4 associada à microfibrila (MFAP4)	P55083	109	84/43	28,972 / 5,38	36,000 / 5,35	24,26% / 0,03	24%	07/21	100
Proteína de ligação a Ran, do tipo III (RNB3L)	Q86VV4	110	60/44	35,971 / 4,94	31,000 / 5,34	13,82% / 0,4	18%	05/14	100

FONTE: O autor (2015)

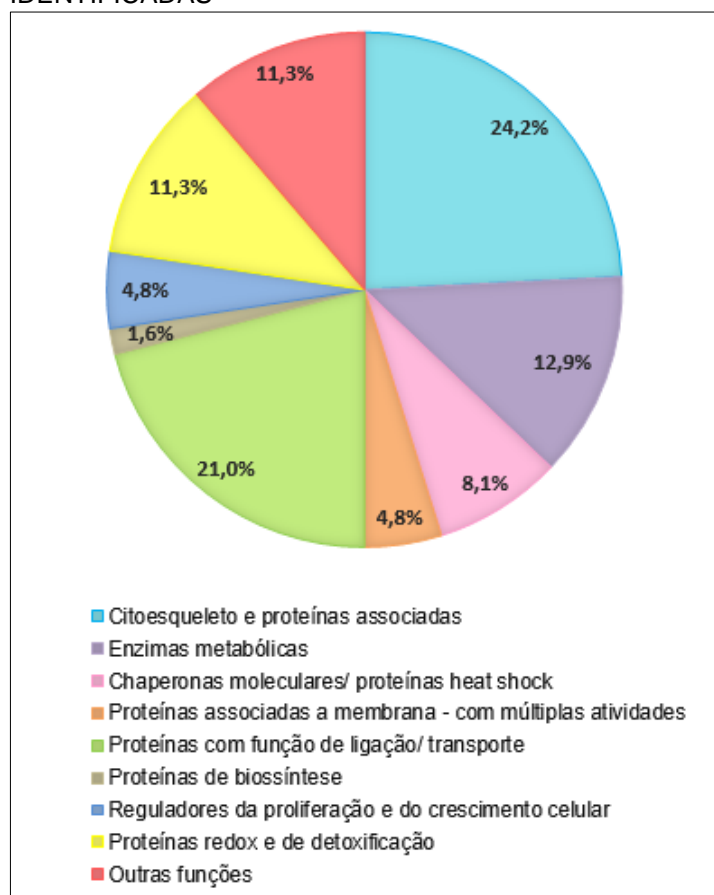
LEGENDA: **MM** – Massa Molecular; **pI** – ponto isoelétrico; **ppm** – partes por milhão.

NOTA: Na comparação entre os tecidos mamários não tumoral contralateral e da mama com o tumor, os *spots* destacados em cinza corresponderam à mesma proteína. \* *Spots* que possuem mais de uma proteína como provável identificação em função da homologia de sequência entre ambas. \*\* *Spot* identificado com valores de score e de peptídeos sobrepostos abaixo do limite aceitável para a identificação.

A fragmentação de peptídeos para obtenção da sequência de aminoácidos em questão, realizada pela espectrometria de massa em tandem (MS/MS), foi utilizada para corroborar as identificações por PMF acima descritas. Ao todo, 31 *spots* contêm essa informação, correspondendo a 21 proteínas. O apêndice 2 apresenta os dados de MS/MS obtidos.

As proteínas identificadas no proteoma do tecido NTC foram categorizadas em classes funcionais, com base em suas principais funções biológicas, conforme descrito por Pucci-Minafra e colaboradores (2006). Informações descritas nos bancos de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* e NCBI também fundamentaram a classificação das proteínas. O gráfico 1 apresenta as categorias funcionais observadas no presente estudo.

GRÁFICO 1 – CLASSES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS



FONTE: O autor (2015)

## 5.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E RESPECTIVO TUMOR PRIMÁRIO DE MAMA

A análise comparativa das proteínas expressas pelo tumor primário e pelo tecido contralateral foi realizada para três pacientes, de forma individual. Os *spots* diferencialmente expressos entre ambos os tecidos foram definidos através da análise interclasse, que permite avaliar diferenças de expressão significativas entre as duas classes de géis (FIGURA 13).

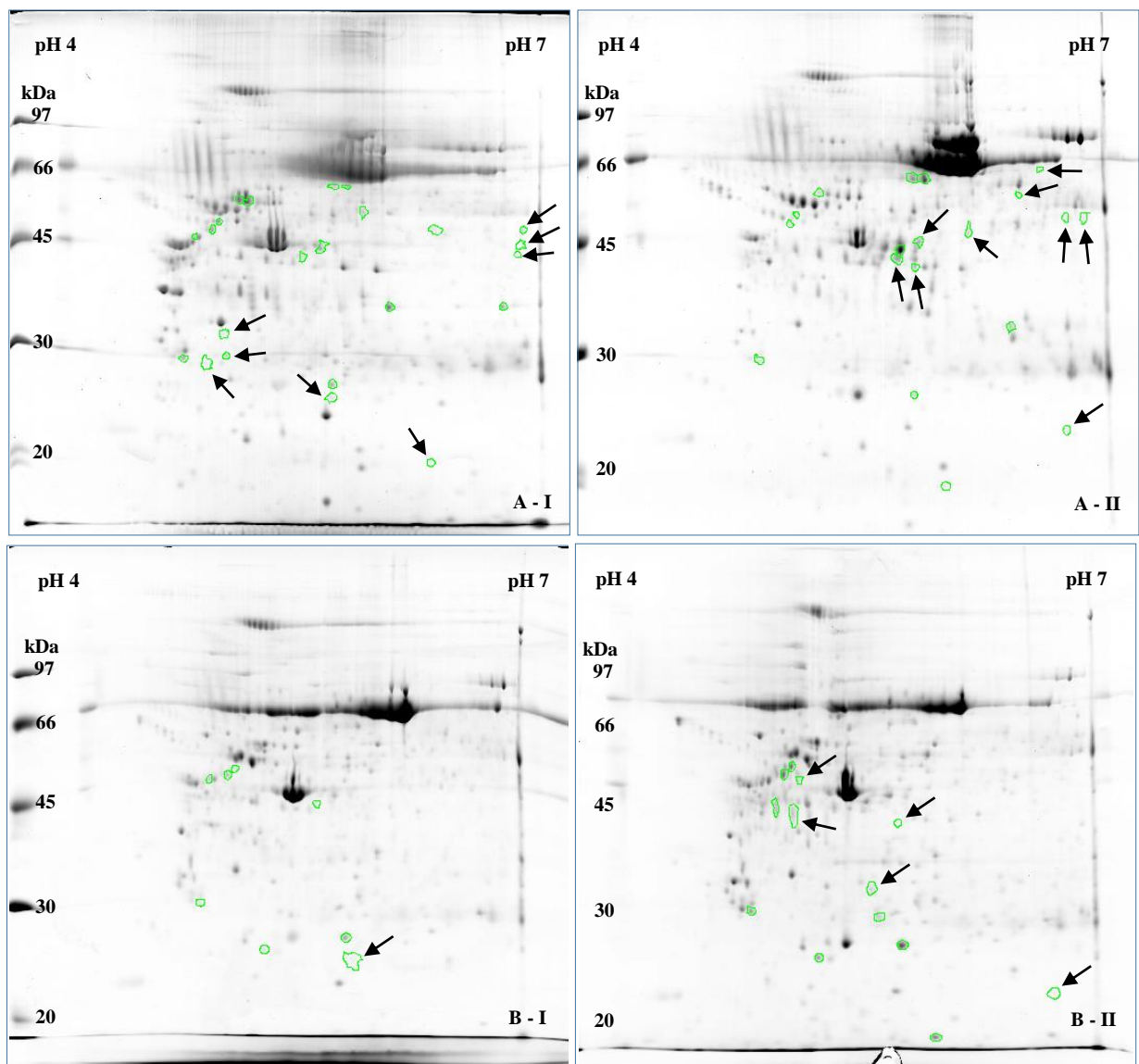


FIGURA 13 – SPOTS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE O TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E O TUMOR (continua)

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: P4 a P8 representam os códigos das pacientes.

NOTA: A – P4; B – P7; (I) Géis 2D do tecido não tumoral contralateral. (II) Géis 2D do tecido do tumor. As setas indicam os *spots* exclusivos de cada tecido.



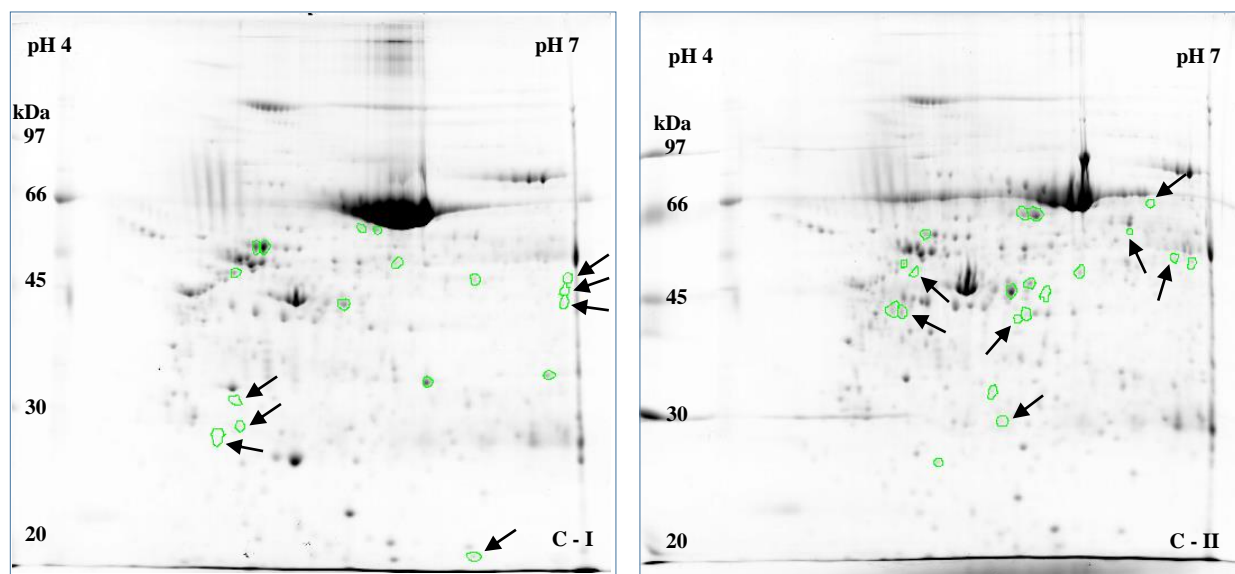


FIGURA 13 – SPOTS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE O TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E O TUMOR (conclusão)

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: P4 a P8 representam os códigos das pacientes.

NOTA: **C** – P8; **(I)** Géis 2D do tecido não tumoral contralateral. **(II)** Géis 2D do tecido do tumor. As setas indicam os *spots* exclusivos de cada tecido.

Géis 2D da paciente P4 foram definidos como os mais representativos da população amostral e, com base nestes, foram definidos os valores de *pI* e *MM* para as proteínas identificadas – a paciente P8 também foi utilizada para os casos em que os *spots* não estavam representados na primeira. O *matching* entre as três amostras de cada tecido possibilitou verificar a abrangência de expressão dos *spots*, em particular para aqueles previamente selecionados como diferencialmente expressos em cada paciente. Presentes em pelo menos duas destas, os *spots* exclusivos para cada tecido, bem como aqueles comuns a ambos e que apresentaram diferença significativa de expressão ( $p < 0,05$ ), foram submetidos à identificação por PMF.

Nas amostras analisadas, foram detectados oito *spots* exclusivos para o tecido NTC, com uma identificação positiva; e sete *spots* exclusivos para o T, sendo duas proteínas diferentes identificadas e três *spots* correspondendo a ALBU. Vinte e três *spots*, com três proteínas identificadas (aumento de expressão no tecido NTC), foram comuns a ambos os tecidos com diferença de expressão significativa. A figura 14 representa as diferenças de expressão observadas para as proteínas identificadas e a tabela 3 descreve estas proteínas incluindo dados de identificação por PMF.

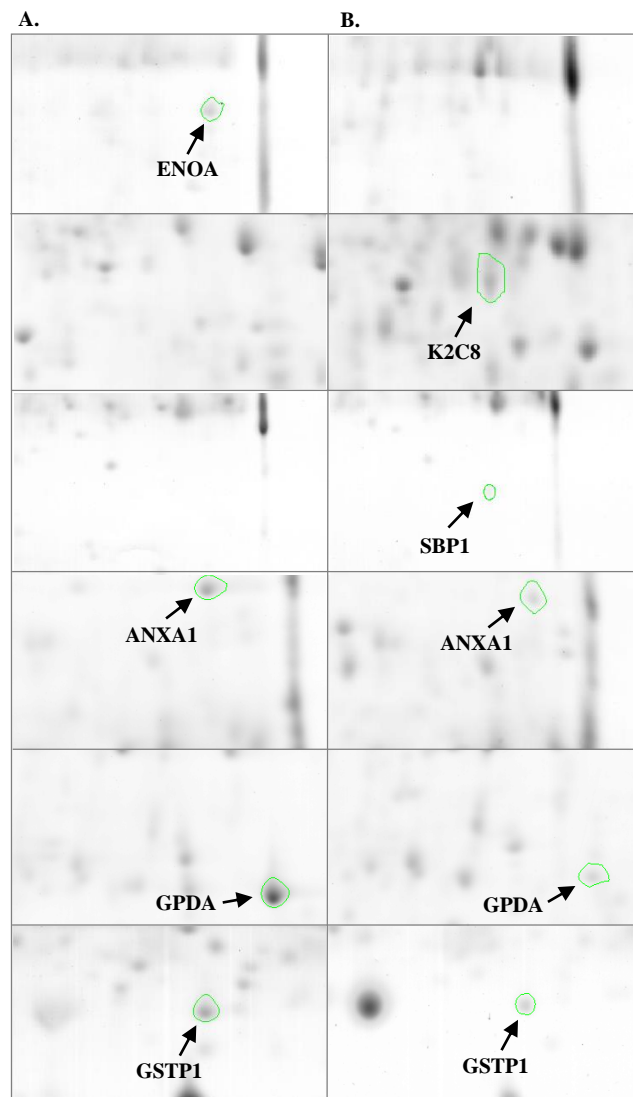


FIGURA 14 – SPOTS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE O TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E O TUMOR

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Imagens dos géis 2D representam a diferença de expressão observada entre o tecido não tumoral contralateral (A) e o tumor primário correspondente (B).

TABELA 4 – PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE O TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E O TUMOR E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI teóricos	MM (kDa)/ pI observados	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Cobertura de sequência	Peptídeos sobrepostos	Erro (ppm)
<b>Exclusivas do tecido não tumoral contralateral</b>								
Enolase-alfa (ENOA)	P06733	69 / 33	47,481 / 7,01	47,00 / 6,89	1,01% / 0,12	18	6 / 11	50
<b>Exclusivas do tecido do tumor</b>								
Queratina do citoesqueleto tipo II – 8 (K2C8)	P05787	115 / 45	53,671 / 5,52	43,00 / 5,07	19,88% / 0,45	26	17 / 32	100
Proteína de ligação ao selênio 1 (SBP1)	Q13228	70 / 47	52,928 / 5,93	23,00 / 6,78	56,54% / 0,85	24	6 / 14	100
<b>Comuns a ambos os tecidos (p&lt;0,05)</b>								
Anexina A1 (ANXA1)	P04083	158 / 33	38,918 / 6,57	34,00 / 6,76	12,64% / 0,19	37	10 / 13	100
Glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática NAD <sup>+</sup> (GPDA)	P21695	197 / 36	38,171 / 5,81	34,00 / 6,04	10,93% / 0,23	52	12 / 18	50
Glutathione S-transferase P (GSTP1)	P09211	105 / 37	23,569 / 5,43	26,00 / 5,78	10,31% / 0,35	54	8 / 24	50

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: **MM** – Massa Molecular; **pI** – ponto isoelétrico; **ppm** – partes por milhão.

As proteínas identificadas na análise comparativa pertencem às seguintes classes funcionais: enzimas metabólicas (ENOA e GPDA), proteínas redox e de detoxificação (GSTP1), citoesqueleto e outras associadas a este (K2C8), proteínas com função de ligação/transporte (SBP1) e proteínas associadas à membrana (ANXA1).

Os critérios avaliados para a identificação foram suportados para as sete proteínas descritas na comparação; o único valor abaixo do ideal foi observado para ENOA, cujo percentual de cobertura de sequência foi 18, sendo próximo ao limite aceito. Quanto às variações de MM e pI, a proteína SBP1 apresentou valores acima do ideal para ambos os parâmetros e, portanto, não pode ser considerada na posição esperada no gel.

### 5.3 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TECIDOS NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DA MAMA COM O TUMOR

Após a obtenção das proteínas identificadas no tecido NTC, foi realizada uma comparação dos proteomas expressos pelos tecidos mamários não tumorais contralateral e da mama com o tumor, objetivando sobrepor as identificações contidas em ambos. Este último pertence ao banco de dados de estudos proteômicos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), do Departamento de Genética, da UFPR. A análise foi realizada pelo mesmo programa (*ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* – GE Healthcare), e demonstrou *matching* para 102 dos 110 *spots* avaliados (FIGURA 15) e apenas um *spot* (45 – VTDB) estava ausente no tecido da mama com o tumor e expresso no tecido contralateral, para todas as amostras analisadas.

Nesta comparação, foram constatadas 45 identificações sobrepostas, isto é, os *spots* pareados (*matches*) corresponderam a mesma proteína, tanto na identificação realizada no tecido contralateral quanto nas identificações contidas no tecido da mama com o tumor (FIGURA 15); um *spot* (8 – TBA1A/TBA1B) foi divergente, sendo identificado como outra proteína (A1AT) na mama com o tumor. As 56 identificações restantes foram obtidas somente no NTC e ainda não constam no banco de dados do tecido não tumoral da mama com o tumor.

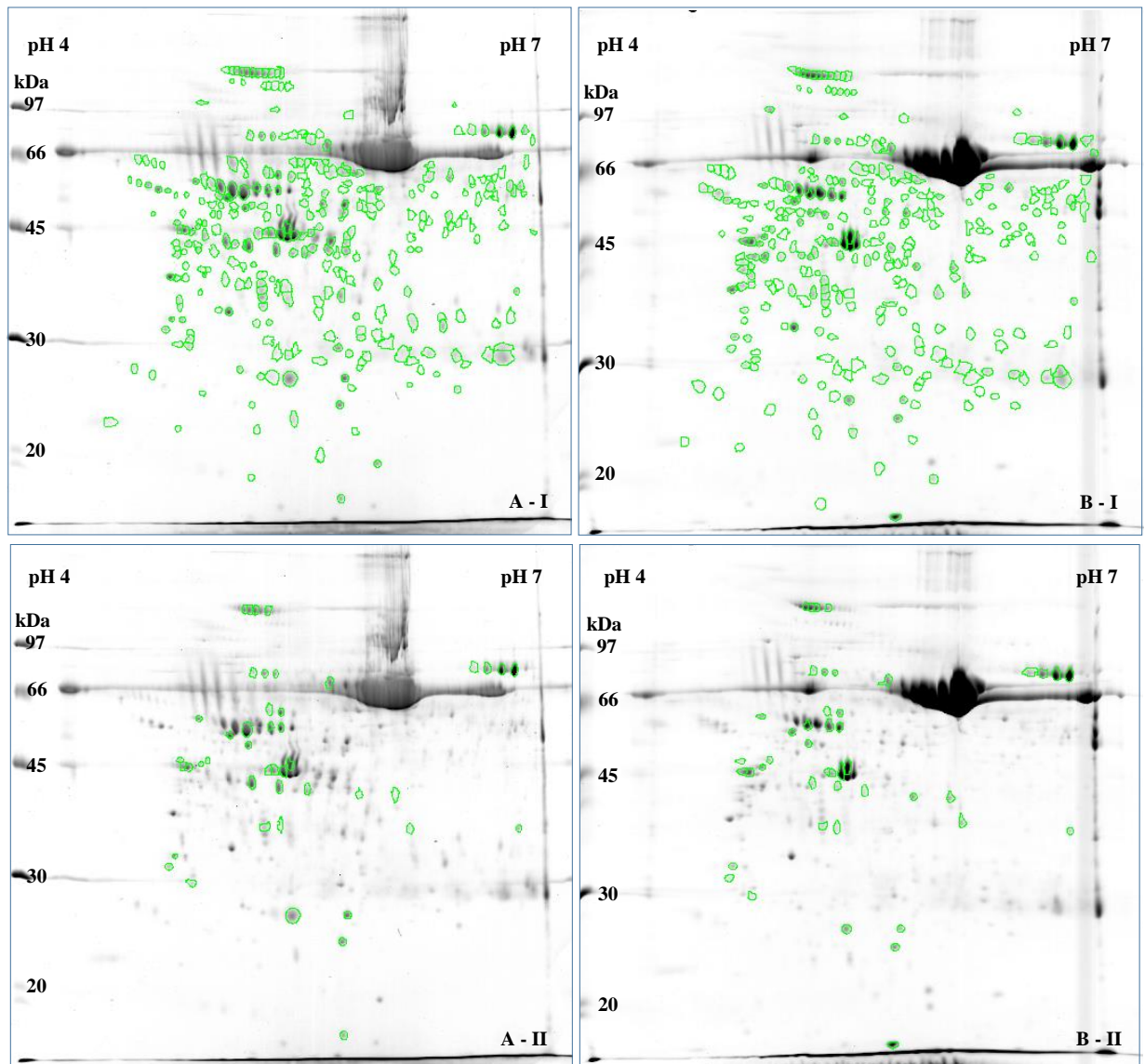


FIGURA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TECIDOS NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DA MAMA COM O TUMOR

FONTE: O autor (2015)

NOTA: **A** – Gel 2D *master* do tecido não tumoral contralateral; **B** – Gel 2D do tecido não tumoral da mama com o tumor – banco de dados do LabCHO. (I) os *spots* pareados (*matches*) entre ambos os tecidos estão destacados em verde (II) As identificações comuns entre ambos os tecidos estão em destaque.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ABORDAGEM PROTEÔMICA NO ESTUDO DO TECIDO MAMÁRIO

Um dos aspectos que evidenciam a importância do estudo das proteínas é o fato de elas refletirem o estado atual do funcionamento de uma célula/tecido e, regulando ou sendo reguladas, consistirem no produto final da expressão gênica. De importância clínica, um grande número de pesquisas objetiva a identificação de biomarcadores de estados patológicos específicos que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e terapêutica de doenças.

Neste contexto, a caracterização proteica de tecidos saudáveis pode fornecer informações relevantes sobre o desenvolvimento e a manutenção da homeostase tecidual, podendo contribuir para o melhor entendimento das alterações relacionadas à patogênese e, em particular, à formação de tumores.

No presente estudo, amostras de tecido mamário não tumoral contralateral de oito pacientes foram analisadas pelo método proteômico, com o objetivo de obter um panorama das proteínas expressas pelo tecido mamário em condições saudáveis. De três das oito pacientes foi analisado o proteoma do tumor, permitindo a comparação entre os dados obtidos em ambos os tecidos, NTC e T.

O método empregado no estudo foi definido por permitir a separação de proteínas a partir de misturas biológicas complexas, como os tecidos em questão, com boa nitidez e resolução no gel 2D. Entretanto, a eletroforese bidimensional requer um preparo adequado da amostra, com a eliminação da fração adiposa, uma vez que o procedimento inicial de extração das proteínas é determinante para o sucesso dos passos subsequentes da análise, principalmente, em relação à confecção dos géis 2D.

A obtenção de extratos proteicos para a realização da 2D-PAGE necessita de uma quantidade considerável de tecido, ao contrário do que ocorre para a extração de ácidos nucleicos, o que representa uma limitação da técnica.

Outro critério para a constituição da amostra deste estudo foi a inclusão de pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo (CDI). Considerando a heterogeneidade dos tumores mamários, o rigor na minimização dos efeitos de

variáveis controláveis é um requisito básico para a obtenção de dados com maior confiabilidade. Assim, optou-se pela análise do subtipo histológico mais frequente, embora os CDI ainda apresentem algumas dificuldades quanto a definição molecular.

Em função da quantidade limitada de material biológico disponível em cada amostra, o protocolo para a extração das proteínas foi alterado para se ajustar a valores próximos a 200mg, ao invés de 400mg previamente padronizados. Para algumas amostras todo o material foi utilizado, maximizando o conteúdo proteico do extrato. Para aproximadamente 200mg de amostra, foi estabelecido como ideal o volume de 700µL de Tampão de Lise, uma vez que os 1.000µL padronizados poderiam resultar em extratos pouco concentrados e a metade desse volume não forneceria a quantidade de sobrenadante necessária para produzir triplicatas das amostras.

Conforme Qin e Ling (2012), a reprodutibilidade é estabelecida pelo fato da primeira dimensão da separação ser realizada com um gradiente de pH imobilizado – tiras de IPG. A opção pela faixa de pH 4-7, adotada neste estudo, permite uma separação mais acurada das proteínas, resultando em uma análise mais detalhada do proteoma. No entanto, deve-se ressaltar que uma parcela da amostra não foi representada no gel devido a estreita cobertura de pH. Além disso, esta abrangência de pH foi utilizada em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, o que viabiliza a comparação dos dados obtidos.

No que se refere à identificação proteica, a obtenção de espectros de massa adequados para que esta seja válida está sujeita a uma série de variáveis, dentre as quais destaca-se a quantidade de peptídeos do *spot*, a calibração (externa e interna) do equipamento e a intensidade do *laser* durante a ionização dos peptídeos. A presença de contaminantes, sinais de matriz e a quantidade de ruído de fundo também podem interferir no padrão de picos de massa, comprometendo as informações a serem comparadas com o banco de dados *Swiss-Prot*, na plataforma MASCOT.

Ainda quanto a identificação das proteínas, conforme descrito em Material e Métodos, devem ser satisfeitos pelo menos dois dos critérios de identificação, sendo eles: *score* acima de 56, percentual mínimo de 20% para cobertura de sequência e, no mínimo quatro peptídeos sobrepostos. As diferenças entre os valores esperados e observados de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) foram avaliados conforme os parâmetros  $\Delta MM < 20\%$  e  $\Delta pI < 0,6$ , provenientes do estudo de Caron e colaboradores (2002), no qual foi estabelecido um mapa proteômico para células

linfoblastóides B; estes parâmetros também foram adotados por Dupont e colaboradores (2005) ao descrever o proteoma e o secretoma de células musculares lisas arteriais.

Em alguns casos, diferentes *spots* foram identificados como sendo a mesma proteína. Estes correspondem a diferentes isoformas de uma proteína, as quais possuem diferentes valores de MM e pI, propriedades que podem sofrer alterações em decorrência de modificações pós-traducionais (MPTs).

MTPs são modificações químicas covalentes das proteínas que ocorrem após a tradução de mRNAs. Essas modificações são importantes porque desempenham funções essenciais na regulação da biologia de uma célula, uma vez que podem, potencialmente, alterar propriedades físicas ou químicas das proteínas, refletindo em sua atividade, conformação, localização celular ou estabilidade, com implicações na função das mesmas (ZARETSKY & WRESCHNER, 2008; FARLEY e LINK, 2009).

Muitas proteínas são alteradas pela adição ou remoção de um radical químico em um aminoácido ou nas extremidades N-terminal e C-terminal da cadeia polipeptídica. As MPTs mais comumente identificadas incluem fosforilação, acetilação, glicosilação, ubiquitinação, metilação, sumoilação, nitrosilação, sulfatação e acilação.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL

A glândula mamária apresenta relevante heterogeneidade em sua composição em função das mudanças cíclicas que ocorrem devido às alterações hormonais, o que implica em dificuldades para definir um padrão de “normalidade” para o tecido em condições sadias. Nesse sentido, Hondermark e colaboradores (2008) indicam a importância e a necessidade de estudos que o avaliem em diferentes condições fisiológicas previamente à compreensão das alterações no funcionamento desse tecido quando comprometido pela neoplasia.

As constantes mudanças hormonais, que refletem em diferenças de expressão proteica, podem explicar, em parte, a variação observada no número de *spots* detectados para cada paciente.



Além disso, considerando que são necessários cerca de seis a oito anos para que um tumor seja clinicamente detectável (TOILLON et al., 2007), há uma dificuldade em se estabelecer este perfil de “normalidade”, uma vez que o que é considerado não tumoral já pode estar nas etapas iniciais da carcinogênese, com efeitos na expressão proteica, por exemplo. Daí a importância da análise de um tecido sem nenhuma manifestação neoplásica, para que as informações obtidas possam ser interpretadas com representativas da mama sadia.

A análise do proteoma do tecido NTC, realizada no presente estudo, resultou na identificação de 62 proteínas distintas em 110 *spots*. O erro de tolerância máximo foi de 100 ppm. Para 35,4% (39 *spots*) das identificações, foi possível obter resultados satisfatórios com 50 ppm e para 1,8% (dois *spots*: 28 – CAPG; 16 – TPM1) o erro ultrapassou este limite – 150 ppm –, mas os dados de MS/MS corroboram a identificação (APÊNDICE 2).

Em geral, para todas as identificações foram satisfeitos pelo menos dois dos parâmetros descritos anteriormente, sendo eles: *score*, percentual de cobertura de sequência e número de peptídeos sobrepostos. Valores abaixo do ideal foram observados para o segundo critério – percentual de cobertura de sequência – em 16 *spots* (14,5%), mas não comprometeram as identificações em função dos demais parâmetros avaliados.

A identificação por PMF do *spot* 77 (PRDX3) não atendeu aos critérios acima citados, apresentando *score* 47 e três dentre cinco peptídeos pareados. A primeira opção de identificação, com *score* 63, foi o polipeptídeo intermediário dineína axonemal leve (IDLC). Entretanto, a fragmentação de dois picos por MS/MS corroborou a identificação de PRDX3.

Também verificou-se que quatro *spots* (3,6%) – 75, 86, 106 e 110 – foram identificados com valores de *score* próximos ao limite de significância (56); dois deles (75 – PRDX6 e 86 – ERP29) foram confirmados pelos demais critérios e apresentaram-se na posição esperada no gel; o *spot* 110 (RNB3L) também foi observado na posição esperada no gel e foi identificado com 18% de cobertura de sequência, próximo ao valor limite; já o *spot* 106 (FETUA), apresentou 15% de cobertura de sequência e variações inconsistentes de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI), condição esta que também foi observada para a outra identificação de FETUA, presumivelmente em decorrência de MPTs. Para confirmar estas

identificações faz-se necessário a complementação com a obtenção da sequência de aminoácidos dos peptídeos, através da técnica MS/MS.

As diferenças entre os valores esperados e observados de MM e pI foram avaliados conforme os parâmetros. Das 110 identificações, 71,8% (79 *spots*) foram observadas na posição esperada no gel 2D; 10% (11 *spots*) diferiram em MM; 10,9% (12 *spots*) quanto ao pI; e 7,3% (8 *spots*) não estavam de acordo com o esperado, não ocorrendo nas margens propostas. As identificações para estes *spots* que apresentaram divergência na posição esperada no gel foram confirmadas pelos demais critérios acima mencionados, além de dados de MS/MS disponíveis para alguns deles (APÊNDICE 2). As diferenças entre MM e pI teóricos e experimentais pode ser explicada, em parte, pela ocorrência de MPTs.

Informações do banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* indicam que as MTPs mais frequentemente para as 62 proteínas identificadas incluem acetilação, fosforilação, formação de pontes dissulfeto e glicosilação; metilação e oxidação também são descritas. A ocorrência destas modificações químicas pode ser sugerida no gel 2D através de alterações no padrão de migração vertical e/ou horizontal das proteínas, em função de pI e/ou MM alterados, resultando na localização diferenciada da proteína em relação aos valores teóricos. Segundo Halligan (2009), MTPs, frequentemente, podem ser observadas como *spots* em sequência no gel. É o caso, por exemplo, para as proteínas colágeno VI cadeia alfa-1 (CO6A1), sorotransferrina (TRFE) e glicoproteína alfa-1B (A1BG).

A acetilação altera o pI no sentido ácido, devido ao aumento de cargas negativas causado pela substituição de grupamentos amino (positivamente carregados) de lisinas por grupos acetil (carga negativa) (RAMOS e BORA, 2004). A fosforilação é a modificação mais comum e está relacionada a diversos processos celulares; a introdução de grupos altamente carregados na proteína resulta na alteração do pI, de acordo com a quantidade de resíduos fosforilados, deslocando-o no sentido ácido (HALLIGAN, 2009). Além de alterar a mobilidade horizontal das proteínas no gel 2D, a fosforilação também aumenta a MM da proteína; a metilação tem papel similar, alterando a MM. (FARLEY e LINK, 2009). A glicosilação, por sua vez, altera a massa e a carga global das glicoproteínas, devido a adição resíduos neutros ou carregados (OWENS e NETTLESHIP, 2010), enquanto a formação de pontes dissulfeto diminui a MM (FARLEY e LINK, 2009).

### 6.2.1 Classes funcionais identificadas

As 62 proteínas identificadas no presente estudo foram categorizadas em nove classes funcionais. A maioria compreende proteínas do citoesqueleto e outras associadas a este (24,2%); proteínas com função de ligação/transporte (21%), enzimas metabólicas (12,9%) e proteínas redox e de detoxificação (11,3%) também foram observadas com relevante expressão. As demais proteínas pertencem a outras classes menos expressas, como chaperonas moleculares (8,1%); reguladores da proliferação e do crescimento celular (4,8%); proteínas associadas à membrana (4,8%); e biossíntese de proteínas (1,6%). Proteínas com outras funções (11,3%) foram incluídas em uma categoria à parte.

#### 6.2.1.1 Citoesqueleto e proteínas associadas (24,2%)

A classe funcional mais frequente no presente estudo compreende proteínas do citoesqueleto e associadas. O citoesqueleto consiste em um sistema dinâmico e altamente complexo, responsável pela manutenção do formato das células e sua organização interna, e por fornecer suporte mecânico para diversos processos celulares, como divisão celular, motilidade, adesão, polaridade, trânsito intracelular e transdução de sinal (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006; O'CONNOR e ADAMS, 2010). Alterações nos componentes do citoesqueleto, relacionadas à carcinogênese, têm sido descritas em diversos estudos (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007; CHAO *et al.*, 2012; JOOSSE *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012; GROSS, 2013; CALAF *et al.*, 2014; DE *et al.*, 2014).

Para esta classe, foram identificados 30 *spots*, correspondendo a 17 proteínas distintas. Actinas (ACTA, ACTB, ACTC, ACTG e ACTH) e citoqueratinas (K1C10, K1C14, K1C18, K1C19 e K2C7) foram as mais abundantes; tubulinas (TBA1A, TBA1B e TBB5), tropomiosinas (TPM1 e TPM4), vimentina (VIME) e a proteína reguladora de actina (CAPG) também foram observadas.

Actinas e tubulinas compreendem proteínas que constituem duas das principais classes de elementos do citoesqueleto: os filamentos de actina, que apresentam cerca de 6nm de diâmetro, e os microtúbulos, de aproximadamente 25nm (O'CONNOR e ADAMS, 2010). Ambas são proteínas altamente conservadas evolutivamente e são

fundamentais para as células eucarióticas. A semelhança entre elas dificulta a distinção por PMF, sendo, por exemplo, frequentemente descrita a detecção de actinas simultaneamente em um mesmo *spot* (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006; COSTA, 2011). Da mesma forma, as tubulinas formam uma superfamília de proteínas, na qual as tubulinas alfa e beta apresentam maior similaridade entre si, sendo amplamente conservadas entre as espécies (OAKLEY, 2010). Neste estudo, 5 *spots* apresentaram mais de uma proteína como possibilidade identificação, sendo 4 referentes a actinas (10, 11, 12 e 13) e um a tubulinas (8).

Os filamentos intermediários compõem o terceiro principal componente do citoesqueleto e são essenciais nas funções biomecânicas da célula, evitando o estiramento excessivo da mesma. Proteínas desta família apresentam expressão variável em tipos celulares distintos e em seus tumores correspondentes. (QIN *et al.*, 2009). A vimentina e as citoqueratinas, identificadas em dez e seis *spots*, respectivamente, pertencem a esse grupo de proteínas.

A VIME é expressa em várias células não epiteliais, especialmente nas células mesenquimais (por exemplo, fibroblastos e miofibroblastos), sendo considerada como um marcador de origem celular mesenquimal (CHALLA e STEFANOVIC, 2011). No câncer, apresenta importante função metastática, promovendo motilidade para as células cancerosas (CREIGHTON, GIBBONS e KURIE, 2013).

Diferenças de expressão de citoqueratinas são amplamente utilizadas para diferenciar os subtipos epiteliais na glândula mamária, sendo KC19 para células lumbais ductais, KC18 para células lumbais alveolares e KC14 para células mioepiteliais (HASSIOTOU e GUEDES, 2012). Os três tipos foram observados neste estudo, além de K1C10 e K2C7.

Várias proteínas interagem e se ligam a actina, regulando sua dinâmica na célula. Entre elas, as tropomiosinas, que formam polímeros ao longo dos filamentos de actina, desempenham uma importante função na regulação da estabilidade da actina, do acesso de outras proteínas, da transdução de sinais, além de atuar na contratilidade, em células musculares. Quanto às isoformas identificadas no presente estudo, sugere-se que TPM1, detectada no tecido sadio e ausente no tumor, atue como supressor de tumor e que a perda de sua expressão esteja associada com o potencial metastático de vários tumores primários, inclusive o de mama (RAVAL *et al.*, 2003); enquanto TPM4 apresenta expressão elevada no tumor e baixas quantidades ou traços no tecido não tumoral da mama com o tumor (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007).

Outra proteína com função relacionada à regulação de filamentos de actina é a CAPG, que se liga a extremidade destes filamentos, de modo reversível e dependente de cálcio, contribuindo para a regulação da motilidade em células não musculares (VAN IMPE *et al.*, 2013; NCBI, 2015). Diversos tipos de câncer, incluindo o de mama, apresentam expressão elevada desta proteína, sendo que os maiores níveis são observados nas margens do tumor, onde as células com capacidade invasiva estão localizadas, o que indica que atue no aumento da motilidade celular e na disseminação do tumor (KANG *et al.*, 2010; VAN IMPE *et al.*, 2013).

#### 6.2.1.2 Proteínas com função de ligação/ transporte (21%)

Esta classe funcional está representada por 13 proteínas distintas, identificadas em 34 *spots*. As proteínas mais frequentes apresentam funções relacionadas à recuperação de íons ferro do grupo HEME, presente nas hemoglobinas, como a sorotransferrina (TRFE), a hemopexina (HEMO) e a haptoglobina (HPT), totalizando 12 *spots*; e aquelas envolvidas na regulação dos processos de coagulação sanguínea, que somam 14 *spots* e incluem antitrombina III (ANT3), antitripsina alfa-1 (A1AT) e os componentes da fibrina, fibrinogênio cadeias beta e gama (FIBB e FIBG, respectivamente).

A TRFE transporta íons ferro para todas as células em proliferação, estimulando este processo. A HEMO tem alta afinidade por grupos HEME e se liga a estes, permitindo o transporte até o fígado, onde ocorre a recuperação de íons ferro, e pode ter envolvimento na proteção das células contra o estresse oxidativo. Já a HPT é responsável pela captura de hemoglobinas livres e a consequente reciclagem de íons ferro. A atividade destas proteínas previne a eliminação de ferro pelos rins e o dano renal pela hemólise.

O ferro é importante na replicação do DNA por atuar como co-fator de uma das enzimas chave deste processo, a ribonucleotídeo redutase (GOMME e McCANN, 2005). Alterações no metabolismo do ferro têm sido descritas em células cancerosas, inclusive no desenvolvimento/progressão do câncer de mama. O câncer é, frequentemente, associado a uma inflamação crônica e os sinais inflamatórios podem promover a alteração da expressão de proteínas envolvidas no transporte de ferro e,

potencialmente, reduzir os níveis plasmáticos de ferro (LAMY, DURIGOVA e JACOT, 2014).

As proteínas ANT, A1AT, FIBB e FIBG estão envolvidas na cascata de coagulação, sendo as duas primeiras pertencentes à família serpina (*serine protease inhibitor*) e as duas últimas correspondem a monômeros que se unem para formar a fibrina, cuja função está relacionada à manutenção da homeostase, atuando como um dos componentes primários do coágulo sanguíneo (WEISEL, 2005).

ANT3 e A1AT são inibidoras de protease serina, cuja função envolve processos biológicos como regulação da coagulação sanguínea, ativação do sistema complemento, apoptose, angiogênese, inflamação e supressão de tumor (VAN GENT *et al.*, 2003).

Além do plasma, a proteína ANT3 também está presente nos compartimentos extracelulares e foi observada no leite materno, em complexo com a matriptase (um de seus alvos), uma proteína expressa em vários tipos de epitélio e em alguns leucócitos, e que está envolvida na formação e manutenção da integridade do epitélio (CHOU *et al.*, 2011). A matriptase, também denominada ST14 (proteína supressora de tumor 14), atua na degradação da matrix extracelular e tem sido sugerido seu envolvimento no carcinoma mamário, com aumento de expressão em células do tumor (ZORATTI *et al.*, 2015).

A proteína A1AT também atua na modulação de muitos aspectos da resposta de fase aguda da inflamação e, em conjunto com a HPT, são reconhecidas como marcadores inflamatórios. Para ambas há a descrição de níveis elevados de expressão em pacientes com câncer de mama (CDI), sendo sugerido um possível envolvimento de A1AT no crescimento do tumor, uma vez que esta apresentou aumento de expressão conforme o grau do tumor (HAMRITA *et al.*, 2009).

Além da função relacionada à coagulação, as proteínas FIBB e FIBG atuam nas primeiras fases de reparo de lesões, desempenhando papel na estabilização e orientação da migração celular durante o restabelecimento do epitélio (DREW *et al.*, 2001). O fibrinogênio tem sido descrito na indução a sinais proliferativos que, por sua vez, promovem respostas de adesão celular, proliferação e migração durante a angiogênese e o crescimento do tumor (AKAKURA *et al.*, 2006).

As demais proteínas identificadas apresentam funções específicas, como transporte de vitaminas A e D para seus tecidos-alvo – proteínas de ligação ao retinol 4 (RBP4) e à vitamina D (VTDB), respectivamente; transporte de hormônios da tireoide

– transtieritina (TTHY), a qual também interage com complexos RET4-retinol, promovendo seu transporte; efluxo de colesterol do fígado para excreção e atuação na formação de ésteres colesteril – apolipoproteína A-I (APOA1); interação com DNA e histonas, sugerindo atividade reguladora da cromatina – componente amilóide P do soro (SAMP); e função inibidora de ribonucleases – inibidor de ribonuclease (RINI).

A VTDB é uma proteína multifuncional, que apresenta atividade na resposta imune, quando convertida em fator ativador de macrófago, o qual tem propriedades antiangiogênicas e antitumorigênicas (ANIC *et al.*, 2014). No câncer de mama, as proteínas VTDB e HEMO foram identificadas com expressão elevada no fluido do aspirado de mamilo (NAF) de pacientes portadoras da doença, sendo descrita expressão similar para o receptor de vitamina D (VDR) (PAWLIK *et al.*, 2006).

A RBP4 pertence à família das lipocalinas e é um transportador específico para o retinol (vitamina A) distribuindo-o do fígado para os tecidos periféricos. A interação com retinol promove a estabilidade deste no plasma, prevenindo danos oxidativos que a molécula sofreria se estivesse livre (RAGHU e SIVAKUMAR, 2004). No plasma, o complexo RBP-retinol interage com a TTHY que, além de atuar no transporte de retinol, é uma das três proteínas que realizam o transporte de hormônios tireoidais (T3 e T4) no plasma, prevenindo sua perda por filtração glomerular (RAGHU e SIVAKUMAR, 2004).

A APOA1 é a mais abundante lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma (ZAMANIAN-DARYOUSH *et al.*, 2013) e a principal HDL responsável pela proteção das células contra a toxicidade dos lipopolissacarídeos, se ligando a estes de forma a neutralizá-los (MA *et al.*, 2004). Propriedades anti-inflamatórias, antioxidativas e antitumorigênicas têm sido descritas para esta proteína, que apresenta papel no crescimento do tumor, angiogênese e metástase e é indicada como potencial biomarcador para diagnóstico e prognóstico de cânceres de pâncreas, ovário e mama (HAMRITA *et al.*, 2011).

A SAMP consiste em uma glicoproteína, comumente encontrada no plasma, pertencente às pentraxinas – proteínas altamente conservadas cujos membros são conhecidos por se ligarem a vários ligantes na dependência de cálcio (KIERNAN *et al.*, 2004). Dentre as funções sugeridas para esta proteína estão a regulação da estrutura da cromatina e a resistência a infecção bacteriana (HUTCHINSON, HOHENESTER e PEPYS, 2000).

A RINI é uma proteína com função biológica não bem conhecida, sabe-se que podem proteger as células, regulando ou bloqueando a atividade de ribonucleases com funções intracelulares e monitorar o estado de oxidação das células em resposta a fatores como o envelhecimento e o estresse oxidativo (DICKSON, HAIGIS e RAINES, 2005). Além disso, estão envolvidas na angiogênese, bloqueando a atividade ribonucleotídica da angiogina por ligar-se a ela (DICKSON *et al.*, 2009).

#### 6.2.1.3 Enzimas metabólicas (12,9%)

Pertencentes a esta classe, foram identificadas oito proteínas para os oito *spots* analisados. Sendo elas: ATP sintase subunidade beta (ATPB), enolase-alfa (ENOA), complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QRC1), adenosilhomocisteinase (SAHH), lactoilglutamina liase (LGUL), pirofosfatase inorgânica (YPIR), glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD, citoplasmática (GPDA) e aldeído desidrogenase citosólica (AL1A1).

Duas correspondem a enzimas mitocondriais, relacionadas a cadeia respiratória: a ATPB produz ATP a partir de ADP na presença de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna da mitocôndria, durante a fosforilação oxidativa; e QRC1 compõe o complexo ubiquinol-citocromo c redutase (complexo III ou citocromo bc1), constituinte da cadeia respiratória mitocondrial, e catalisa a oxidação da coenzima Q (reduzida) pelo citocromo c.

A ENOA é uma metaloenzima multifuncional que participa de vários processos biológicos, sendo reconhecida por sua atuação na glicólise (síntese de piruvato) (DÍAZ-RAMOS *et al.*, 2012). Também pode estar presente na superfície de muitas células – inclusive as mamárias –, atuando como receptor de plasminogênio e mediando a ativação de plasmina e a degradação da matrix extracelular (CAPELLO *et al.*, 2011). Esta proteína, conforme descrito nos resultados, foi identificada na amostra P4 NTC, na análise comparativa com o tecido T, e o *matching* foi observado em seis amostras de tecido NTC.

A SAHH é uma enzima conservada evolutivamente e é responsável pela hidrólise reversível de S-adenosilhomocisteína (SAH) em adenosina (Ado) e homocisteína (Hcy). Desempenha uma relevante função na regulação das reações de metilação na célula (LEAL *et al.*, 2008), uma vez que os radicais metil (CH<sub>3</sub>), utilizados



neste processo, são oriundos de S-adenosilmetionina (SAM), a qual é formada a partir de SAH (LI *et al.*, 2014). SAHH tem sido indicada como supressora de tumor e sua baixa expressão foi detectada em vários tipos de tumores, incluindo cólon e pulmão (LEAL *et al.*, 2008).

A LGUL, também denominada glioxalase I, atua na detoxificação de metilglioxal, um produto da glicólise, promovendo sua conversão a s-lactoil-glutathione, seu correspondente não citotóxico (WANG *et al.*, 2012). Também está relacionada a proliferação e apoptose em células cancerosas e tem sido descrita como superexpressa em vários tumores, incluindo cólon, mama, ovário, próstata, pulmão, estômago e rins (WANG *et al.*, 2012). Para o câncer de mama, a expressão elevada de LGUL está relacionada com o tamanho do tumor em grau avançado (FONSECA-SÁNCHEZ, *et al.*, 2012).

As demais identificações compreendem enzimas envolvidas nas vias de metabolismo de fosfatos (YPIR); de carboidratos e de lipídeos (GPDA) e de retinol (AL1A1). A enzima YPIR é responsável pela hidrólise de pirofosfato em fosfato inorgânico (Pi), em circunstâncias nas quais o primeiro é utilizado para fornecer energia, em substituição ao ATP (JEONG *et al.*, 2012). A GPDA atua na conversão reversível de diidroxiacetona fosfato (DHAP) em glicerol-3-fosfato (G3P), na presença de NADH, reduzindo-o a NAD<sup>+</sup> (NCBI, 2015) e fornecendo substrato para a síntese de triacilgliceróis no tecido adiposo. Sendo assim, tem sido descrito como marcador da diferenciação de adipócitos (SLEDZINSKI *et al.*, 2013). A AL1A1, por sua vez, atua no metabolismo de aldeídos intracelulares e tem sido sugerida sua importância na tumorigênese mamária (ZHENG *et al.*, 2014).

A AL1A1 apresenta relevância na clínica do câncer, inclusive o de mama. Sua expressão em células cancerosas tem sido associada a características típicas de células-tronco, como capacidade clonal e quimioresistência inata, aspectos que contribuem para a capacidade invasiva do tumor (ALAMGEER *et al.*, 2014) e fazem desta enzima um marcador confiável para células tronco de câncer de mama (OHI *et al.*, 2011).

#### 6.2.1.4 Proteínas redox e de detoxificação (11,3%)

Esta classe está representada por seis proteínas distintas, identificadas em oito *spots*. Proteínas pertencentes à família das peroxirredoxinas somam 6 identificações, sendo elas PRDX2, PRDX3, PRDX4 e PRDX6. Enzimas da superfamília glutational S-transferases compreendem GSTM3 e GSTP1 e a proteína DJ-1 (PARK7) também compõem esta categoria funcional.

As proteínas desta classe compreendem enzimas que realizam funções importantes no catabolismo celular e na proteção contra estresses metabólicos, sendo o controle da redução/oxidação (redox) um processo fundamental para manter a homeostase do organismo (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006). Além disso, participam da detoxificação de xenobióticos, prevenindo danos às células.

Reações redox são essenciais para o metabolismo celular, principalmente no que concerne à transdução biológica de energia no interior da mitocôndria. Como consequência, diversos componentes sofrem modificações redox, algumas necessárias para funções de transdução de sinal. Condições de estresse oxidativo – com aumento nos níveis de pró-oxidantes ou diminuição de enzimas antioxidantes – têm sido associadas a diversas patologias, incluindo o câncer (HANSCHMANN *et al.*, 2013).

Peroxiredoxinas apresentam um importante papel protetivo para a célula, atuando na eliminação de peróxidos gerados durante o metabolismo celular e também participam em atividades celulares redox-sensíveis, como a regulação da sinalização celular, proliferação e apoptose (GONCALVES, SULLIVAN e PHELAN, 2012). No câncer de mama, os tipos de PRDX aqui identificados são descritos com expressão elevada em relação ao tecido sadio (KARIHTALA *et al.*, 2003; GONCALVES, SULLIVAN e PHELAN, 2012). Sugere-se que a expressão elevada de PRDX em células cancerosas consiste em uma adaptação ao estresse oxidativo, fornecendo proteção para a sobrevivência destas células (GONCALVES, SULLIVAN e PHELAN, 2012).

As proteínas GSTM3 e GSTP1 são responsáveis pela detoxificação de carcinógenos, drogas terapêuticas, toxinas ambientais e produtos do estresse oxidativo, por conjugá-los à glutational, permitindo a sua eliminação. Ambas as proteínas são codificadas por genes altamente polimórficos, implicando em variantes

funcionais que determinam diferenças individuais na suscetibilidade a carcinógenos e toxinas (NCBI, 2015).

A proteína DJ-1 (PARK7) participa de diferentes vias de sinalização intracelular que protegem a célula do estresse oxidativo e da apoptose. Está envolvida em vários processos biológicos, como a regulação transcricional, mitocondrial, função antioxidante, protease cisteína, chaperona redox-regulada e ligação a RNA. Sua expressão, localização, oxidação e fosforilação, frequentemente, encontram-se alterados em tumores, sendo a participação de DJ-1 implicada na iniciação, progressão e metastização do câncer, atuando na proliferação, invasão, quimioresistência e apoptose. Esta proteína apresenta expressão elevada em diversos tumores, dentre eles o mamário (CAO *et al.*, 2014). Foi incluída nesta classe funcional em função de sua atividade antioxidativa ser bem estabelecida, apesar de os mecanismos subjacentes a essa função ainda não estarem bem caracterizados.

#### 6.2.1.5 Chaperonas moleculares e proteínas *heat shock* (8,1%)

Chaperonas e outras enzimas auxiliam no dobramento das proteínas, um processo importante para a aquisição da conformação nativa e funcional das mesmas, na qual as cadeias lineares de polipeptídeos são convertidas em estruturas tridimensionais. Durante o dobramento, são formadas pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteínas, conferindo estabilidade a proteína ou permitindo sua ligação covalente a outras proteínas (WILKINSON e GILBERT, 2004). O dobramento incorreto de uma proteína, além de acarretar na perda da função, também resulta no acúmulo destas em agregados insolúveis, podendo interferir nas funções celulares e ocasionar doenças, como o Alzheimer (WILKINSON e GILBERT, 2004).

Pertencendo a esta classe, foram identificadas quatro proteínas diferentes, nos cinco *spots* identificados: proteínas dissulfeto isomerase A1 e A3 (PDIA1 e PDIA3, respectivamente), proteína do retículo endoplasmático 29 (ERP29) e proteínas *heat shock* de 60kDa mitocondrial (HSP60) e de 27kDa (HSPB1).

As proteínas dissulfeto isomerase pertencem à superfamília tiorredoxina, que compreende enzimas ditiol/dissulfeto oxidoreduases. São essenciais para o dobramento de proteínas recém sintetizadas e atuam como chaperonas moleculares do retículo endoplasmático. Tem por função introduzir dissulfetos nas proteínas

(atividade oxidase) e catalisar o rearranjo de dissulfetos incorporados erroneamente (atividade isomerase) (WILKINSON e GILBERT, 2004). O envolvimento de proteínas dissulfeto isomerase na tumorigênese mamária tem sido indicado para a viabilidade de carcinomas mamários metastáticos no linfonodo (THONGWATCHARA *et al.*, 2011).

A ERP29 possui o domínio estrutural N-terminal característico de proteínas dissulfeto isomerase, a ausência de um motivo ativo impede sua atividade redox, como a edição de dissulfetos, entretanto, está implicada no dobramento de proteínas endógenas que são secretadas, função esta sugestiva de suposta chaperona (MKRTCHIAN e SANDALOVA, 2006; ZHANG e RICHARDSON, 2011). ERP29 é expressa em altos níveis nos tecidos ativamente secretores, como as glândulas mamárias, salivares, tireoides, próstata, pâncreas, entre outros (MKRTCHIAN e SANDALOVA, 2006). Esta proteína em sido amplamente implicada na tumorigênese epitelial para alguns tumores, no entanto, com função pouco conhecido, podendo estar envolvida na regulação da TEM, uma vez que sua superexpressão implica em aquisição do fenótipo epitelial (ZHANG e RICHARDSON, 2011).

As proteínas *heat shock* HSP60 e HSPB1 pertencem a um grupo de chaperonas heterogêneo e altamente conservado evolutivamente, cujos membros apresentam funções variadas, muitas das quais relacionadas à resposta ao estresse e ao dobramento de proteínas (CAPPELO *et al.*, 2008). Proteínas desta família auxiliam no dobramento, degradação e transporte intracelular de proteínas (GHOSH *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que alterações na expressão de HSP60 e HSPB1 em tumores quando comparados a tecidos saudáveis, indicando envolvimento na tumorigênese (GHOSH *et al.*, 2008; GRZEGRZOLKA, *et al.*, 2012).

#### 6.2.1.6 Reguladores da proliferação e do crescimento celular (4,8%)

Nesta classe foram observadas três proteínas distintas, sendo quatro *spots* correspondentes à mimecan (MIME) e dois aos membros beta e épsilon da família 14-3-3 (1433B e 1433E, respectivamente).

A proteína MIME, também denominada osteoglicina, pertence à família dos proteoglicanos, mais especificamente aos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (*small leucin-rich proteoglycans* - SLRP) e um dos componentes da matriz extracelular

de tecidos conectivos, influenciando na montagem da matriz extracelular, no crescimento celular e na migração. A MIME também atua na fibrilogênese do colágeno e há indícios de que atue na regulação do crescimento celular, uma vez que pode ser induzida por p53 – uma importante proteína supressora de tumor. A ausência de MIME é observada em diferentes tumores e linhagens celulares de câncer, nos quais, frequentemente, o gene *TP53* está inativado/mutado. (TASHEVA *et al.*, 2002).

A família 14-3-3 é constituída por proteínas que se ligam especificamente a fosfoserina/fosfotreonina, participando das vias de sinalização fosfo-reguladas que determinam muitos processos biológicos, incluindo regulação do ciclo celular, tráfico de proteínas, regulação metabólica, proliferação celular e apoptose. A regulação de um amplo espectro de atividades biológicas é alcançada mediante a interação com diversas proteínas-alvo, incluindo fatores de transcrição, enzimas biossintéticas, proteínas do citoesqueleto, moléculas de sinalização, fatores apoptóticos e supressores de tumor. Essas interações resultam em alterações na localização subcelular, conformação, estabilidade, estado de fosforilação, atividade e/ou interações moleculares. A multiplicidade de processos modulados coloca as proteínas 14-3-3 como componentes regulatórios-chave de processos importantes para o crescimento e desenvolvimento normal da célula, os quais, frequentemente, encontram-se alterados no câncer (FREMAN e MORRISON, 2011).

#### 6.2.1.7 Proteínas associadas à membrana (4,8%)

Esta classe funcional está representada por três proteínas distintas, identificadas em quatro *spots*, sendo elas: anexinas A1 e A3 (ANXA1 e ANXA3, respectivamente) e proteína de canal de cloreto intracelular tipo I (CLIC1).

Pertencente à família das anexinas, proteínas ligadoras de fosfolípidos dependentes de cálcio, as isoformas A1 e a A3 apresentam função na regulação do crescimento celular e nas vias de transdução de sinais, bem como na regulação da função da enzima fosfolipase A2 (PLA2) e, ainda, apresentam atividade anti-inflamatória (NCBI, 2015).

A relevância no câncer de mama e as funções biológicas das isoformas A1, A2, A4 e A5 das anexinas são melhor estabelecidas do que para ANXA3 (DENG *et al.*, 2013). A ANXA1 desempenha importantes funções na mobilidade intracelular de

vesículas e está implicada em eventos relacionados à membrana, em vias endo e exocitóticas (MASCHLER *et al.*, 2010). Além disso, ANXA1 consiste em um eficiente supressor metastático, por reinduzir propriedades epiteliais em células cancerosas que estão em processo de TEM (MASCHLER *et al.*, 2010). Alterações na expressão de ANXA1 têm sido descritas em vários tumores, sendo ausente ou fortemente reduzida, principalmente, em estágios avançados de progressão e superexpressa em estágios iniciais da tumorigênese, como adenomas (MASCHLER *et al.*, 2010). A ANXA3, observada superexpressa em linhagens de carcinoma mamário (MCF-7, MDA-MB-435) por Zeng e colaboradores (2013), tem sido sugerida como biomarcadora de prognóstico desfavorável para o câncer de mama, por regular negativamente a apoptose, permitindo a proliferação celular.

A proteína CLIC1 pertence à família p64, que regula processos celulares fundamentais, incluindo estabilização do potencial de membrana celular, transporte transepitelial, manutenção do pH intracelular e regulação do volume celular (NCBI, 2015). CLIC1 pode existir na forma de proteínas globulares solúveis ou integradas à membrana plasmática e nuclear, com função de canal de íons, apresentando papel na manutenção da estrutura de organelas intracelulares via interações entre membrana e citoesqueleto (LITTLER *et al.*, 2010).

#### 6.2.1.8 Biossíntese de proteínas (1,6%)

A proteína ribossomal 40S (RSSA), também conhecida como receptor de laminina de 60kDa, atua como proteína ribossomal estrutural e possui envolvimento na tradução, embora este processo ainda seja pouco conhecido (MALYGIN *et al.*, 2011). Também tem função de receptor de laminina, o que a torna uma importante molécula na adesão celular à membrana basal e na transdução de sinais.

A laminina-1, um de seus ligantes, consiste na principal glicoproteína da membrana basal de todos os tipos de tecidos e está envolvida em diversos processos biológicos, como adesão celular, diferenciação, proliferação, migração e está relacionada ao crescimento do tumor e à metástase (NELSON *et al.*, 2008). A RSSA pode ser relevante na tumorigênese, uma vez que a laminina é o principal substrato de adesão para células cancerosas invasivas – a adesão à membrana basal é necessária para que, então, ocorra a degradação desta por enzimas específicas – e

esta interação ocorre via receptores de laminina, incluindo RSSA (NELSON *et al.*, 2008).

#### 6.2.1.9 Outras funções (11,3%)

Proteínas identificadas não categorizadas nas classes acima descritas totalizam sete, observadas em 13 *spots*. Sendo elas: cadeia alfa-1 do colágeno VI (CO6A1), glicoproteína 4 associada à microfibrila (MFAP4), inibidores de dissociação Rab/GDP beta (GDIB), glicoproteína alfa-2HS (FETUA), glicoproteína alfa-1B (A1BG), proteína de ligação a Ran, do tipo III (RNB3L) e a proteína complemento C3 (CO3).

Os colágenos consistem no componente mais abundante da matriz extracelular de quase todos os tecidos conectivos e apresentam uma grande diversidade de estruturas e funções (FITZGERALD, HOLDEN e HANSEN, 2013). O subtipo identificado no presente estudo pertence ao colágeno do tipo VI, cadeia alfa-1 (CO6A1), que constitui uma das seis cadeias (alfa-1–6) descritas para o colágeno VI. Esta proteína contribui para funções essenciais do ambiente de matriz extracelular, fornecendo suporte estrutural para as células, fatores de crescimento, citocinas e outros ligantes. O aumento da expressão estromal de colágeno VI tem sido associado a vários eventos da tumorigênese, incluindo progressão maligna, migração, invasão, quimioresistência, entre outros (IYENGAR *et al.*, 2005).

A MFAP4 pertence à superfamília das proteínas relacionadas ao fibrinogênio e também é um dos constituintes da matriz extracelular (WULF-JOHANSSON *et al.*, 2013). O perfil de expressão nos tecidos humanos, bem como as funções biológicas de MFAP4 não são bem caracterizadas, mas há indícios de expressão elevada em tecidos que apresentam alto conteúdo de elastina, como as paredes das artérias e a pele. Sugere-se função na manutenção da integridade da matriz extracelular, na formação de fibras de elastina, na homeostase tecidual, além de estar associada ao remodelamento da matriz extracelular durante danos vasculares, entre outros (SAEKMOSE *et al.*, 2013; WULF-JOHANSSON *et al.*, 2013).

A proteína GDIB pertence à família de inibidores de dissociação Rab/GDP, que possui papel crítico na reciclagem de GTPases Rab envolvidas no transporte intracelular de moléculas entre organelas (NCBI, 2015). As proteínas Rab constituem uma ampla família de pequenas GTPases monoméricas que coordenam vários

estágios do transporte vesicular e têm sido associadas a tumorigênese, facilitando a adesão e a migração de células cancerosas. Igualmente, GDIB está envolvida no desenvolvimento de diversos tumores, sendo expressa de forma alterada em relação ao tecido não tumoral (MING *et al.*, 2014).

A FETUA e a AIBG, identificadas em 2 e 3 *spots*, respectivamente, são glicoproteínas encontradas no plasma, sendo a primeira envolvida em diversos processos biológicos normais e patológicos, como prevenção da calcificação ectópica e regulação do metabolismo ósseo, resistência à insulina, migração e sinalização proliferativa em células cancerosas de mama (MORI, EMOTO e INABA, 2011). A A1BG possui similaridade de sequência com regiões variáveis de algumas imunoglobulinas, entretanto sua função biológica é desconhecida. Sua expressão também foi detectada no tecido mamário não tumoral da mama com o tumor (COSTA *et al.*, 2011), em concordância com o observado no tecido NTC.

Pertencente à classe das proteínas de ligação a Ran, a proteína RNB3L, também denominada RanBP, possui um ou mais domínios de ligação à proteína Ran e está envolvida em diversas funções no transporte nuclear (LANGER *et al.*, 2011). A proteína CO3, por sua vez, possui um papel central na ativação do sistema complemento, via alternativa associada à imunidade inata, e é responsável por estimular diretamente a degranulação de mastócitos, a quimiotaxia e a ativação de leucócitos, além de induzir a contração em células musculares (GUPTA *et al.*, 2014). Esta proteína também atua como mediador inflamatório que, quando ativado, aumenta a permeabilidade vascular e permite a liberação de várias substâncias vasoativas, causando a inflamação (CHEN *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2014). Há indicações de que a proteína CO3 apresenta expressão elevada em alguns tipos de câncer, como o do pâncreas e do estômago (KITANO e KITAMURA, 1993; CHEN *et al.*, 2013).

### 6.3 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E RESPECTIVO TUMOR PRIMÁRIO DE MAMA

Complementar à análise do proteoma do tecido NTC, foi realizado um estudo comparativo, no intuito de elencar proteínas com diferença significativa de expressão entre o tumor e o tecido sadio, em particular aquelas cuja expressão foi exclusiva para



um destes. Estas proteínas fundamentarão análises posteriores que objetivam compreender o papel funcional das mesmas, bem como suas interações, no contexto da tumorigênese mamária, integrando métodos genômicos e proteômicos à bioinformática.

A comparação entre o padrão de expressão de proteínas por tecidos em condições sadias e patológicas tem sido analisada em diversos estudos, através da utilização de várias técnicas. As informações que podem ser obtidas pela abordagem comparativa contribuem para a compreensão dos processos biológicos subjacentes a doenças, incluindo a identificação de moléculas-chave relacionadas a funções e vias metabólicas envolvidas no estabelecimento/progressão da patologia, bem como alterações nos níveis de componentes celulares que podem ser determinantes na desregulação de processos críticos para o desenvolvimento da mesma.

Neste contexto, a proteômica se destaca como um importante método para detectar proteínas envolvidas na patogênese. Alterações nos níveis proteicos e/ou nas propriedades das proteínas (localização subcelular, interações proteicas, etc.) podem determinar mudanças na sinalização de eventos e processos celulares, resultando na desregulação funcional do tecido, o que pode contribuir para o surgimento do câncer. De fato, a tumorigênese é mediada por uma série de alterações que, por fim, resultam na expressão ou não de proteínas específicas, cuja presença/ausência pode ser determinante na iniciação, progressão e metastização do câncer.

Estudos proteômicos comparando tecidos mamários tumorais e não tumorais da mama com o tumor sugerem aumento no suprimento sanguíneo do tumor, através de componentes de proteínas plasmáticas identificadas; vias regulatórias que são controladas por modificações pós-traducionais, como ubiquitinação, indicada pela superexpressão de unidades pertencentes ao sistema ubiquitina-protease. Também ocorre proliferação ativa das células malignas e um aumento do metabolismo de substâncias, indicado pela detecção de proteínas envolvidas na síntese proteica e proteases relacionadas à infiltração tecidual (DENG *et al.*, 2006).

Comparações entre tumor mamário e tecido não tumoral da mama com o tumor também revelaram proteínas associadas à tumorigênese, sendo super ou subexpressas em relação ao estado sadio. A análise comparativa de 13 amostras pareadas de tumor mamário (CDI GII/GIII) e tecido não tumoral da mama com o tumor, realizada por Pucci-Minafra e colaboradores (2007), por exemplo, indicou 34 proteínas diferencialmente expressas. Com base nos mesmos critérios de Pucci-Minafra e

colaboradores (2006), anteriormente descrito, estas proteínas foram agrupadas em 8 categorias, sendo incluída uma nova classe funcional compreendendo proteínas séricas.

No presente estudo, a análise comparativa foi possível para três pacientes, número este que pode ser limitante para analisar com precisão quais as diferenças de expressão proteica subjacentes ao processo da carcinogênese como um todo. Todavia, o estudo foi informativo e demonstrou diferenças de expressão qualitativa e quantitativa entre ambos os tecidos, totalizando 38 *spots*.

A complexidade da tumorigênese pode ser, inicialmente, evidenciada pela quantidade de proteínas expressas pelo tumor em relação ao tecido não tumoral. Este aspecto foi destacado por Pucci-Minafra e colaboradores (2007), ao detectar uma maior quantidade de *spots* no tumor em comparação ao tecido sadio (1.500 x 1.200). No presente estudo, essa diferença foi menor – com valores médios de 723 *spots* no tumor e 609 no tecido contralateral –, talvez, em decorrência da quantidade de amostras analisadas. Contudo, é possível observar que o tumor apresenta um proteoma quantitativamente mais complexo que a contraparte não tumoral, característica esta que pode refletir o repertório de processos biológicos existentes no microambiente de desenvolvimento e progressão do tumor.

O estudo comparativo foi realizado, primeiramente, de forma individual, avaliando isoladamente o padrão de expressão para cada paciente. Considerando a quantidade de amostras disponível para comparação, a definição dos *spots* a serem investigados como diferencialmente expressos entre ambos os tecidos foi realizada de forma conjunta. Assim, *spots* que apresentaram diferença de expressão e que estavam presentes em apenas uma paciente não foram considerados, uma vez que podem consistir em variações biológicas individuais e comprometer a interpretação dos dados, pois podem não ser representativas em relação à tumorigênese ou suficientemente informativas sobre o padrão de expressão proteica dos tecidos em estudo.

Dentre os *spots* de interesse, foi possível a identificação de duas proteínas exclusivas do T, uma do tecido NTC e três comuns a ambos. A albumina, identificada em três *spots*, não foi considerada na análise.

A proteína enolase-alfa (ENOA), observada exclusivamente no tecido NTC, é uma metaloenzima multifuncional que participa de vários processos biológicos e, no câncer, está superexpressa, promovendo a migração celular e a metástase, além de

suprir a proliferação anaeróbia das células cancerosas. MPTs relacionadas ao câncer têm sido descritas para ENOA, incluindo acetilação, metilação e fosforilação, sendo algumas específicas para cada tipo de tecido/câncer, o que pode refletir a ativação de vias de sinalização pró-mitóticas específicas nas células cancerosas (CAPELLO *et al.*, 2011). Pucci-Minafra e colaboradores (2007) identificaram 5 enzimas envolvidas na via glicolítica – dentre as quais a ENOA – sendo superexpressas no câncer de mama em relação ao tecido não tumoral. No presente estudo, esta proteína foi observada somente no tecido sadio. Entretanto, a ausência da mesma no tumor pode ser decorrente de dificuldades técnicas na separação das proteínas, uma vez que rastros no gel 2D impedem a visualização de *spots* nesta região.

Entre as proteínas identificadas como exclusivas para o T estão a queratina do citoesqueleto tipo II – 8 (K2C8) e a proteína de ligação ao selênio 1 (SBP1).

As citoqueratinas são filamentos intermediários do citoesqueleto de células epiteliais e alterações nos seus padrões de expressão têm sido associadas a transformação de células epiteliais mamárias (IYER *et al.*, 2013). O estudo de Davalieva e colaboradores (2012) identificou a proteína K2C8 superexpressa cerca de três vezes em amostras de tumores CDI em comparação com o tecido não tumoral. Neste estudo, os *spots* que representam K2C8, nas amostras de tumor, estão bem demarcados em termos de intensidade e não há evidências de sua presença no tecido contralateral.

A SBP1 é membro das proteínas que contém selênio e tem sido sugerido sua função no transporte intracelular (intra-golgi) de selênio, embora esta função ainda não tenha sido efetivamente demonstrada. Também pode ter envolvimento na hipóxia, uma vez que consiste em um alvo para fatores induzidos por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ), e na via de degradação proteassomal, por interagir com proteínas relacionadas a esta via (YANG e DIAMOND, 2013).

O selênio é um elemento essencial para muitos processos biológicos e apresenta propriedades anticarcinogênicas, para as quais sua função fisiológica está associada com proteínas que contém selênio (ZHANG *et al.*, 2013). Os mecanismos de prevenção ao câncer podem estar relacionados à melhoria das defesas antioxidantes, com aumento da resposta imune e atividade anti-inflamatória. Para vários tumores, entre eles ovário, pulmão, cólon, estômago e fígado, são descritos níveis reduzidos de SBP1 em relação ao tecido não tumoral, sendo sua baixa expressão associada à progressão do tumor e prognóstico desfavorável (YANG e

DIAMOND, 2013). Zhang e colaboradores (2013) descrevem esta proteína com baixa expressão no câncer de mama e demonstraram a redução na expressão conforme a progressão do tumor. No presente estudo, SBP1 não foi detectada no tecido contralateral e, nas amostras de tumor, a intensidade dos *spots* foi fraca, podendo sugerir níveis reduzidos de SBP1 no tumor.

As três proteínas diferencialmente expressas ( $p < 0,05$ ) cuja detecção foi em comum para ambos os tecidos apresentaram maiores níveis de expressão no tecido contralateral. As identificações correspondem a anexina A1 (ANXA1) e glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD, citoplasmática (GPDA), também identificadas no proteoma do tecido NTC. O *matching* feito para a análise deste último permite sobrepor as informações de *spot ID* e, portanto, mais uma proteína (glutathione S-transferase P – GSTP1) pode ser apresentada na comparação. Esta será posteriormente confirmada e identificada por MS/MS.

No que se refere ao câncer, a ANXA1 consiste em um eficiente supressor metastático, por reinduzir propriedades epiteliais em células cancerosas que estão em processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM) (MASCHLER *et al.*, 2010). Em muitos tumores, predominantemente aqueles que se encontram em estágios avançados de progressão – entre eles o de mama – a expressão de ANXA1 é ausente ou fortemente reduzida; em contrapartida, ANXA1 é descrita com expressão elevada em outros tumores, os quais podem representar estágios iniciais da tumorigênese, como adenomas (MASCHLER *et al.*, 2010). Esta proteína promove a metástase por acentuar vias de sinalização e influenciar na reorganização da actina, facilitando o processo de TEM e, portanto, permitindo a migração e a invasão de células cancerosas, de forma eficiente (GRAAUW *et al.*, 2010).

A enzima GPDA, que está envolvida na síntese de triacilglicerol no tecido adiposo, apresenta níveis de mRNA e atividade elevados no tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos, provavelmente resultando da expansão do tecido adiposo durante a obesidade (SLEDZINSKI *et al.*, 2013). O tecido do tumor utilizado no estudo contém relativamente poucos adipócitos, o que pode justificar a baixa concentração da proteína no tecido T.

A proteína GSTP1 pertence às glutathione S-transferases e atua na detoxificação de substâncias tóxicas e drogas anticâncer. Possui implicação na tumorigênese mamária, uma vez que inibe a apoptose induzida por agentes quimioterápicos, ao interagir com estes. A expressão de GSTP1 em células

cancerosas pode estar associada com a resistência a quimioterapia (MIYAKE *et al.*, 2012).

No que se refere aos parâmetros adotados na identificação proteica, a maioria das proteínas apresentadas foi observada na posição esperada no gel, conforme  $\Delta MM < 20\%$  e  $\Delta pI < 0,6$ , anteriormente citados. Divergências foram detectadas para SBP1, com variações de MM e pI extrapolando os valores adotados como parâmetro. Sugere-se a possibilidade de ocorrência de modificações químicas que interfiram na massa molecular e/ou carga das proteínas, uma vez que descrições de MPTs para SBP1 (acetilação e fosforilação) estejam presentes no banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*. Indica-se a comprovação da identificação destas proteínas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS).

Os demais *spots* para os quais a identificação ainda não foi realizada ou cujos espectros de massa não foram satisfatórios, serão submetidos à espectrometria de massa e os resultados serão analisados para definir proteínas de interesse que integram novos estudos, objetivando obter informações sobre as interações proteicas e funções que as mesmas apresentam na tumorigênese mamária.

A comparação das proteínas expressas pelos tecidos NTC e T compreende uma etapa deste estudo que encontra-se em andamento. A conclusão desta análise fornecerá dados de identificação proteica que serão confrontados com o banco de dados do tumor, pertencente ao LabCHO, para ampliar as informações já obtidas sobre esse tecido, além de contribuir para a análise das proteínas que apresentam diferença de expressão e que já foram investigadas em estudos anteriores.

As proteínas diferencialmente expressas entre os tecidos em condições sadias e patológicas, bem como aquelas que apresentaram alterações de MM e pI de relevância no desenvolvimento do câncer serão, posteriormente, submetidas a procedimentos metodológicos de validação e outras técnicas que permitam obter informações consistentes sobre seu envolvimento na tumorigênese mamária.

#### 6.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TECIDOS NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DA MAMA COM O TUMOR

Quanto à comparação dos proteomas expressos pelos tecidos mamários não tumoral contralateral e da mama com o tumor, A análise demonstrou similaridade de

identidade para 92,73% dos *spots* identificados no tecido contralateral, sendo que os oito não pareados consistem em *spots* localizados em regiões de difícil separação no gel, o que tem implicações no pareamento dos *spots* e outros cuja intensidade de expressão no tecido da mama com o tumor impediu a detecção pelo programa. Destes, apenas um *spot* (45 – VTDB) estava ausente no tecido da mama com o tumor e expresso somente no tecido contralateral, sendo este presente em todas as amostras NTC analisadas.

Sendo assim, nessa análise foram constatadas 45 identificações em comum, isto é, os *spots* pareados correspondem à mesma proteína. O *spot* 8 apresentou-se divergente, sendo identificado no tecido contralateral como TBA1A/TBA1B (*score*: 112; 31% de cobertura de sequência; 12/26 peptídeos pareados) e, no tecido da mama com o tumor como A1AT (*score*: 67; 27% de cobertura de sequência; 9/36 peptídeos pareados). Neste caso, os parâmetros considerados indicaram a primeira identificação como a mais provável e, por tratar-se de uma região no gel de difícil separação das proteínas, os dados referentes a TBA1A/TBA1B foram mantidos.

As 56 identificações restantes estavam presentes somente no tecido contralateral e ainda não constam em nosso banco de dados. O *matching* realizado entre estes tecidos permite inferir que os dados obtidos para o tecido contralateral podem ser extrapolados para ampliar as informações do tecido não tumoral como um todo, uma vez que há correspondência entre os *spots*. Em geral, esta comparação indica a existência de similaridade no padrão de expressão entre os tecidos contralateral e da mama com o tumor.

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo apresenta um panorama das proteínas expressas pelo tecido mamário não tumoral contralateral de pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasor e contribui para a ampliar o conhecimento do proteoma da mama em condições sadias.

As proteínas mais frequentes estão relacionadas ao citoesqueleto e às funções de ligação/transporte, sendo as enzimas metabólicas e as proteínas redox e de detoxificação também observadas com frequência. A análise funcional das proteínas, tanto qualitativa como quantitativa, pode fornecer informações importantes para a compreensão dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento sadio e patológico da mama.

Este estudo também demonstrou relevante similaridade entre os tecidos não tumoral contralateral e da mama com o tumor, o que é informativo sobre a interpretação das condições clínicas deste último tecido. Diferenças qualitativas e quantitativas na expressão proteica entre os tecidos não tumoral contralateral e do tumor primário foram observadas e podem ter envolvimento no câncer de mama. Proteínas diferencialmente expressas ou com alterações de massa molecular e/ou ponto isoelétrico entre estes tecidos são sugestivas da importância das mesmas como indicadores da tumorigênese mamária. No entanto, estas informações iniciais devem ser validadas, inclusive por métodos com maior poder de resolução, para que possam ser interpretadas com maior consistência e permitam compreender a função destas proteínas no câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, Y.; LAMOND, A. I.; A perspective on proteomics in cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 4, p. 257-264, 2014.

AKAKURA, N.; HOOGLAND, C.; TAKADA, Y. K.; SAEGUSA, J.; YE, X.; LIU, F.; CHEUNG, A. T.; TAKADA, Y. The COOH-terminal globular domain of fibrinogen gamma chain suppresses angiogenesis and tumor growth. **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9691-9697, 2006.

ALAMGEER, M.; GANJU, V.; KUMAR, B.; FOX, J.; HART, S.; WHITE, M.; HARRIS, M.; STUCKEY, J.; PRODANOVIC, Z.; SCHNEIDER-KOLSKY, M. E.; WATKINS, D. N. Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, 2014.

ANIC, G. M.; WEINSTEIN, S. J.; MONDUL, A. M.; MÄNNISTÖ, A. M.; ALBANES, D. Serum vitamin D, vitamin D binding protein, and risk of colorectal cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 7, 2014.

BAKRY, R.; RAINER, M.; HUCK, C. W.; BONN, G. K. Protein profiling for cancer biomarker discovery using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and infrared imaging: A review. **Analytica Chimica Acta**, vol. 690, p. 26–34, 2011.

BOUDREAU, A.; VAN'T VEER, L. J.; BISSELL, M. J. An “elite hacker” - Breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity. **Cell Adhesion & Migration**, vol. 6, n. 3, p. 236–248, 2012.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALAF, G. M.; BALAJEE, A. S.; MONTALVO-VILLAGRA, M. T.; LEON, M.; DANIELA, N. M.; ALVAREZ, R. G. ROY, D.; NARAYAN, G.; ABARCA-QUINONES, J. Vimentin and Notch as biomarkers for breast cancer progression. **Oncology Letters**, v. 7, p. 721-727, 2014.



CALVO, K. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICIOIN, E. F. Clinical Proteomics: from biomarker Discovery and cell signaling to individualized personal therapy. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 1/2, p. 107-125, 2005.

CANCEMI, P.; Di CARA, G.; ALBANESE, N. N.; COSTANTINI, F.; MARABETI, M. R.; MUSSO, R.; LUPO, C.; ROZ, E.; PUCCI-MINAFRA, I. Large-scale proteomic identification of S100 proteins in breast cancer tissues. **BMC Cancer**, v. 10, p. 476, 2010.

CAO, J.; LOU, S.; YING, M.; YANG, B. DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, v. 93, n. 3, p. 241-250, 2014.

CAPPELLO, F.; MACARIO, E. C.; MARASÀ, L.; ZUMMO, G.; MACARIO, A. J. L. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 6, p. 801-809, 2008.

CAPELLO, M.; FERRI-BORGOGNO, S.; CAPELLO, P.; NOVELLI, F.  $\alpha$ -enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. **FEBS Journal**, v. 278, n. 7, p. 1064-1074, 2011.

CARON, M.; IMAM-SGHIOUAR, N.; POIRIER, F.; Le CAËR, J.; LABAS, V.; JOUBERT-CARON, R. Proteomic map and database of lymphoblastoid proteins. **Journal of Chromatography**, v. 771, p. 197-209, 2002.

CHALLA, A. A.; STEFANOVIC, B.; A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 18, p. 3773-3789, 2011.

CHAO, S. K.; WANG, Y.; VERDIER-PINARD, P.; YANG, C. H.; LIU, L.; RODRIGUEZ-GABIN, A.; McDAID, H. M.; HORWITZ, S. B. Characterization of a human  $\beta$ V-tubulin antibody and expression of this isotype in normal and malignant human tissue. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 69, n. 8, p. 566-576, 2012.

CHARAFE-JAUFFRET, E.; GINESTIER, C.; MONVILLE, F.; FINETTI, P.; ADELAIDE, J.; CERVERA, N.; FEKAIRI, S.; XERRI, L.; JACQUEMIER, J.; BIRNBAUM, D.; AND BERTUCCI, F. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. **Oncogene**, v. 25, n. 15, p. 2273–2284, 2006.

CHEANG, M. C. U.; CHIA, S. K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J.; WATSON, M.; DAVIES, S.; BERNARD, P. S.; PARKER, J. S.; PEROU, C. M.; ELLIS, M. J.; NIELSEN, T. O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal

B breast cancer. **Journal of the Nacional Cancer Institute**. V. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEN, J.; WU, W.; ZHEN, C.; ZHOU, H.; YANG, R.; CHEN, L.; HU, L. Expression and clinical significance of complement C3, complement C4b1 and apolipoprotein E in pancreatic cancer. **Oncology Letters**, v. 6, n. 1, p. 43-48, 2013.

CHO, Y.; SU, H.; HUANG, T.; CHEN, H.; WU, W.; WU, P.; WU, D.; SHIEA, J. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 415, p. 266-275, 2013.

CHOU, F.; XU, F.; LEE, M. CHEN, Y.; RICHARDS, O. X. D.; SWANSON, R.; ONSOL, S. T.; JOHNSON, M. D.; LIN, C. Matriptase is inhibited by extrinsic antithrombin in epithelial cells but not in most carcinoma cells. **American Journal of Pshysiology – Cell Physiology**, v. 301, p. 1093-1103, 2011.

CICHON, M. A.; DEGNIM, A. C.; VISSCHER, D. W.; RADISKY, D. C. Microenvironmental Influences that Drive Progression from Benign Breast Disease to Invasive Breast Cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 389-397, 2010.

COLLETA, R. D.; CHRISTENSEN, K.; REICHENBERGER, K. J.; LAMB, J.; MICOMONACO, D.; HUANG, L.; WOLF, D. M.; MUELLER-TIDOW, C.; GOLUB, T. R.; KAWAKAMI, K.; FORD, H. L. The Six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin A1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 17, p. 6478–6483, 2004.

COSTA, G. G.; KAVISKI, R.; SOUZA, L. E. R.; URBAN, C. A.; LIMA, R. S.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F. Proteomic analysis of non-tumoral breast tissue. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p 2430-2442, 2011.

CREIGHTON, C. J.; GIBBONS, D. L.; KURIE, J. M. The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective. **Cancer Management and Research**, v. 5, p. 187-195, 2013.

DAVALIEVA, K., KIPRIJANOVSKA, S.; BROUSSARD, C.; PETRUSEVSKA, G.; EFREMOV, G. D. Proteomic analysis of infiltrating ductal carcinoma tissues by coupled 2D DIGE/MS/MS analysis. **Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 421-432, 2012.

DE, S. TSIMOUNIS, A.; CHEN, X.; ROTENBERG, S. A. Phosphorylation of  $\alpha$ -Tubulin by Protein Kinase C Stimulates Microtubule Dynamics in Human Breast Cells. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 71, n. 4, p. 257-272, 2014.

DENG, S. S.; XING, T. Y.; ZHOU, H. Y.; XIONG, R. H.; LU, Y. G.; LIU, S. Q.; YANG, H. J. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 4, n. 3, p. 165-172, 2006.

DENG, S.; WANG, J.; HOU, L.; LI, J.; CHEN, G.; JING, B.; ZHANG, X.; YANG, Z. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. **Oncology Letters**, v. 5, p. 107-112, 2013.

DIAZ-RAMOS, À.; ROIG-BORRELLAS, A.; GARCÍA-MELERO, A.; LÓPEZ-ALEMANY, R.  $\alpha$ -enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

DICKSON, K. A.; HAIGIS, M. C.; RAINES, R. T. Ribonuclease inhibitor: structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Molecular Biology**, v. 80, p. 349-374, 2005.

DICKSON, K. A.; KANG, D. K.; KWON, Y. S.; KIM, J. C.; LELAND, P. A.; KIM, B. M.; CHANG, S. I.; RAINES, R. T. Ribonuclease inhibitor regulates neovascularization by human angiogenin. **Biochemistry**, v. 48, n. 18, p. 3804-3806, 2009.

DJONOV, V.; ANDRES, A.; ZIEMIECKI, A. Vascular Remodelling During the Normal and Malignant Life Cycle of the Mammary Gland. **Microscopy Research And Technique**, vol. 52, p. 182-189, 2001.

DREW, A. F.; LIU, H.; DAVIDSON, J. M.; DAUGHERTY, C. C.; DEGEN, J. L. Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3691-3698, 2001.

DUPONT, A.; CORSEAU, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A. L.; SUSEN, S.; VINCENTELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 585-596, 2005.

FARLEY, A. R.; LINK, A. J. Identification and quantification of protein posttranslational modifications. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 725-763, 2009.

FARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FUMOLEAU, P.; LARSIMONT, D.; MACGROGAN, G.; BERGH, J.; CAMERON, D.; GOLDSTEIN, D.; DUSS, S.; NICOULAZ, A. L.; BRISKEN, C.; FICHE, M.; DELORENZI, M.; IGGO, R. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660-4671, 2005.

FITZGERALD, J.; HOLDEN, P.; HANSEN, U. The expanded collagen VI family: new chains and new questions. **Connective Tissue Research**, v. 54, n. 6, p. 345-350, 2013.

FONSECA-SÁNCHEZ, M. A.; CUEVAS, S. R.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; BAUTISTA-PIÑA, V.; OCAMPO, E. A.; MIRANDA, A. H.; JURADO, V. Q.; MARCHAT, L. A.; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, E. Breast cancer proteomics reveals a positive correlation between glyoxalase 1 expression and high tumor grade. **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 670-680, 2012.

FREEMAN, A. K.; MORRISON, D. K. 14-3-3 Proteins: Diverse Functions in Cell Proliferation and Cancer Progression. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 7, p. 681-687, 2011.

GALVÃO, E.R.C.G.N. Breast cancer proteomics: a review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, vol. 137, n. 6, p. 915-25, 2011.

GAO, W. Analysis of protein changes using two-dimensional difference gel electrophoresis. In: KEOHAVONG, P.; GRANT, S. G. **Springer Protocols: Molecular Toxicology Protocols**. 2 ed. Humana Press, 2014. p. 17-30.

GARNIS, C.; BUYS, T. P.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**. v. 3, n. 9, 2004.

GE HEALTHCARE Handbook. **2D – Electrophoresis: Principles and Methods**. Suécia: Editora Elanders Tofters, 2004.

GHOSH, J. C.; DOHI, T. KANG, B. H.; ALTIERI, D. C. Hsp60 Regulation of Tumor Cell Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 8, p. 5188-5194, 2008.

GJOREVSKI, N; NELSON, C. M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 12, n. 9, p. 581-593, 2011.

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **International Agency for Research on Cancer – World Health Organization**. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 20/01/2015.

GONCALVES, K.; SULLIVAN, K.; PHELAN, S. Differential Expression And Function Peroxiredoxin 1 and Peroxiredoxin 6 in Cancerous M CF-7 and Noncancerous M CF-10A Breast Epithelial Cells. **Cancer Investigation**, v. 30, p. 38-47, 2012.

GONÇALVES, A.; CHARAFRE-JAUFFRET, E.; BERTUCCI, F.; AUDEBERT, S.; TOIRON, Y.; ESTERNI, B.; MONVILLE, F.; TARPIN, C.; JACQUEMIER, J.; HOUVENAEGHEL, G.; CHABANNON, C.; EXTRA, J.; VIENS, P.; BORG, J.; BIMBAUM, D. Protein profiling of human breast tumor cells identifies novel biomarkers associated with molecular subtypes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 8, p. 1420-1433, 2008.

GOOME, P. T.; McCANN, K. B. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267-273, 2005.

GRAAUW, M.; VAN MILTENBURG, M. H.; SCHMIDT, M. K.; PONT, C.; LALAI, R.; KARTOPAWIRO, J.; PARDALI, E.; LE DÉVÉDEC, S. E.; SMIT, V. T.; VAN DER WAL, A.; VAN'T VEER, L. J.; CLETON-JANSEN, A.; TEN DIJKE, P.; VAN DE WATER, B. Annexin A1 regulates TGF-  $\beta$  signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells. **PNAS**, v. 107, n. 14, p. 6340-6345, 2010.

GROSS, S. R. Actin binding proteins - Their ups and downs in metastatic life. **Cell Adhesion & Migration**, v. 7, n. 2, p. 199-213, 2013.

GRZEGRZOLKA, J.; KURNOL, K.; PIOTROW, P.; PULA, B.; KOBIERZYCKI, C.; PIOTROWSKA, A.; JABLONSKA, K.; WOJNAR, A.; RYS, J.; DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M. Hsp27 expression in invasive ductal breast carcinoma. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 50, n. 4, p. 523-533, 2012.

GUIMARÃES, J.R. **Manual de oncologia**. 3. ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica, 2008.

GUPTA, A.; REZVANI, R.; LAPOINTE, M.; POURSHARIFI, P.; MARCEAU, P.; TIWARI, S.; TCHERNOF, A.; CIANFLONE, K. Downregulation of complement C3 and C3aR expression in subcutaneous adipose tissue in obese women. **PLoS One**, v. 9, n. 4, 2014.

HALLIGAN, B. D. ProMoST: A tool for calculating the pI and molecular mass of phosphorylated and modified proteins on 2 dimensional gels. **Methods in Molecular Biology**, v. 527, p. 283-298, 2009.

HAMRITA, B.; CHAHED, K.; TRIMECHE, M.; GUILLIER, C. L.; HAMMANN, P.; CHAÏEB, A.; KORBI, S.; CHOUCANE, L. Proteomics-based identification of  $\alpha$  1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, n. 2, p. 111-118, 2009.

HAMRITA, B.; NASR, H. B.; GABBOUJ, S.; BOUAOUINA, N.; CHOUCANE, L.; CHAHED, K. Apolipoprotein A1 275 G/A and +83 C/T polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in breast cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1637-1643, 2011.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 483-490, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

\_\_\_\_\_. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, vol. 144, p. 646-674, 2011.

HANSCHMANN, E.; GODOY, J. R.; BERNDT, C.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C. H. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins – Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 19, n. 13, p. 1539-1605, 2013.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, p. 29-48, 2012.

HONDERMARCK, H. Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 281-291, 2003.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; TOILLON, R. A.; LE BOURHIS, X. Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1403-1411, 2008.

HOWARD, B. A.; GUSTERSON, B. A. Human Breast Development. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 119-137, 2000.

HUTCHINSON W. L.; HOHENESTER E.; PEPYS, M. B. Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 482-493, 2000.

INCA/MS. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Controle do câncer de mama**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_controle\\_cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama)> Acesso em: 03/02/2015.

INCA/MS. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 03/02/2015.

INCA/MS. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. TNM: Classificação de Tumores Malignos. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

IYENGAR, P.; ESPINA, V.; WILLIAMS T. W.; LIN, Y.; BERRY, D.; JELICKS, L. A.; LEE, H.; TEMPLE, K.; GRAVES, R.; POLLARD, J.; CHOPRA, N.; RUSSELL, R. G.; SASISEKHARAN, R.; TROCK, B. J.; LIPPMAN, M.; CALVERT, V. S.; PETRICOIN III, E. F.; LIOTTA, L.; DADACHOVA, E.; PESTELL, R. G.; LISANTI, M. P.; BONALDO, P.; SCHERER, P. E. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1163–1176, 2005.

IYER, S. V.; DANGE, P. P.; ALAM, H.; SAWANT, S. S.; INGLE, A. D.; BORGES, A. M.; SHIRSAT, N. V.; DALAL, S. N.; VAIDYA, M. M. Understanding the Role of Keratins 8 and 18 in Neoplastic Potential of Breast Cancer Derived Cell Lines, **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.

JARDIM, B. V.; MOSCHETTA, M. G.; LEONEL, C.; GELALETI, G. B.; REGIANI, V. R.; FERREIRA, L. C.; LOPES, J. R.; CAMPOS ZUCCARI, D. A. P. Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study. **Oncology Reports**, v. 30, n. 3, p. 1119-1128, 2013.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JEONG, S.; KO, G. H.; CHO, Y. H.; LEE, Y.; CHO, B.; HA, W.; CHOI, S.; KIM, J. W.; LEE, C. W.; HEO, Y. S.; SHIN, S. H.; YOO, J.; HONG, S. Pyrophosphatase

overexpression is associated with cell migration, invasion, and poor prognosis in gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 33, p. 1889:1898, 2012.

JOSSIE, S. A.; HANNEMANN, J.; SPÖTTER, J.; BAUCHE, A.; ANDREAS, A.; MÜLLER, V.; PANTEL, K. Changes in Keratin Expression during Metastatic Progression of Breast Cancer: Impact on the Detection of Circulating Tumor Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 4, p. 993-1003, 2012.

KANG, S.; KIM, M. J.; AN, H.; KIM, B. G.; CHOI, Y. P.; KANG, K. S.; GAO, M.; PARK, H.; NA, H. J.; KIM, H. K.; YUN, H. R.; KIM, D. S.; CHO, N. H. Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer. **Journal of proteome research**, v. 9, p. 5638-5645, 2010.

KARIHTALA, P.; MÄNTYNIEMI, A.; KANG, S. W.; KINNULA, V. L.; SOINI, Y. Peroxiredoxins in Breast Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 3418-3424, 2003.

KENIFIC, C.; THORBURN, A.; DEBNATH, J. Autophagy and Metastasis: Another double-edged sword. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 241-245, 2010.

KIERNAN, U. A.; NEDELKOV, D.; TUBBS, K. A.; NIEDERKOFER, E. E.; NELSON, R. W. Proteomic characterization of novel serum amyloid P component variants from human plasma and urine. **Proteomics**, v. 4, p. 1825–1829, 2004.

KITANO, E.; KITAMURA, H. Synthesis of the third component of complement (C3) by human gastric cancer-derived cell lines. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 94, n. 2, p. 273-278, 1993.

LAM, S. W.; JIMENEZ, C. R.; BOVEN, E. Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, p. 129-138, 2014.

LAMY, P.; DURIGOVA, A.; JACOT, W. Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer Iron and breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 434, p. 34-40, 2014.

LANGER, K.; DIAN, C.; RYBIN, V.; MÜLLER, C. V.; PETOSA, C. Insights into the function of the CRM1 cofactor RanBP3 for the structure of its ran-binding domain. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.



LARSEN, M. R.; TRELLE, M. B.; THINGHOLM, T. E.; JENSEN, O. N. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. **BioTechniques**, v. 40, n. 6, p. 790-798, 2006.

LEAL, J. F.; BLANCO-APARICIO, C.; HERNÁNDEZ-LOSA, J.; RAMÓN Y CAJAL, S.; CARNERO, A.; LLEONART, M. E. S-adenosylhomocysteinase hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 11, p. 2089-2095, 2008.

LEE, H.; LIM, C.; CHEONG, Y.; SINGH, M.; GAM, L. Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 3, p. 353-362, 2012.

LI, Q.; MAO, L.; WANG, R.; ZHU, L.; XUE, L. Overexpression of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines: effects on apoptosis, migration and adhesion of cells. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p. 2409-2417, 2014.

LITTLER, D. R.; HARROP, S. J.; GOODCHILD, S. C.; PHANG, J. M.; MYNOTT, A. V.; JUANG, L.; VALENZUELA, S. M.; MAZZANTI, M.; BROWN, L. J.; BREIT, S. N.; CURMI, P. M. G. The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? **FEBS Letters**, v. 584, p. 2093-2101, 2010.

LUO, Y.; ZHANG, J.; LIU, Y.; SHAW, A. C.; WANG, X.; WU, S.; ZENG, X.; CHEN, J.; GAO, Y.; ZHENG, D. Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. **Molecular Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 233-244, 2005.

MA, J.; LIAO, X.; LOU, B.; WU, M. Role of Apolipoprotein A-I in Protecting against Endotoxin Toxicity. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 6, p. 419-424, 2004.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary Gland Development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Bio**, v. 1, n. 4, p. 533-557, 2012.

MALYGIN, A. A.; BABAYLOVA, E. S.; LOKTEV, V. B.; KARPOVA, G. G. A region in the C-terminal domain of ribosomal protein SA required for binding of SA to the human 40S ribosomal subunit. **Biochimie**, v. 93, p. 612-617, 2011.

MASCHLER, S. GEBESHUBER, C. A.; WIEDEMANN, E.; ALAKAPTAN, M.; SCHREIBER, M.; CUSTIC, I.; BEUG, H. Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, p. 401-414, 2010.

MAYR, U.; MAYR, M.; YIN, X.; BEGUM, S.; TARELLI, E.; WAIT, R.; XU, Q. Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, p. 4546- 4557, 2005.

McGEE, S. F.; LANIGAN, F.; GILLIGAN, E.; GRONER, B. Mammary gland biology and breast cancer - Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. **EMBO reports**, vol. 7, n. 11, p. 1084-1088, 2006.

MING, Z.; GUO, C.; JIANG, M.; LI, W.; ZHANG, Y.; FAN, N.; ZHONG, Y.; MENG, X.; YANG, S. Bioinformatics analysis of Rab GDP dissociation inhibitor beta and its expression in non-small cell lung cancer. **Diagnostic Pathology**, v. 9, 2014.

MIYAKE, T.; NAKAYAMA, T.; NAOI, Y.; YAMAMOTO, N.; OTANI, Y.; KIM, S. J.; SHIMAZU, K.; SHIMOMURA, A.; MARUYAMA, N.; TAMAKI, Y.; NOGUCHI, S. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. **Cancer Science**, v. 103, n. 5, p. 913-920, 2012.

MKRTCHIAN, S.; SANDALOVA, T. ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 3 & 4, p. 325-337, 2006.

MOHAMED, M. M.; SABET, S.; PENG, D.; NOUH, M. A.; EL-SHINAWI, M.; EL-RIFAI, W. Promoter Hypermethylation and Suppression of Glutathione Peroxidase 3 Are Associated with Inflammatory Breast Carcinogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

MORI, K.; EMOTO, M.; INABA, M. Fetein-A: A multifunctional protein. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 5, n. 2, p. 124-146, 2011.

NAVARRETE, M. A.; MAIER, C. M.; FALZONI, R.; QUADROS, L. G.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C.; NAZÁRIO, A. C. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 306-313, 2005.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 22/02/2015.

NELSON, J.; McFERRAN, N. V.; PIVATO, G.; CHAMBERS, E.; DOHERTY, C.; STEELE, D.; TIMSON, D. J. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. **Bioscience Reports**, v. 28, n. 1, p. 33-48, 2008.

OAKES, S. R.; GALLEGU-ORTEGA, D.; ORMANDY, C. J. The mammary cellular hierarchy and breast cancer. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 71, n. 22, p. 4301-4324, 2014.

OAKES, S. R.; HILTON, H. N.; ORMANDY, C. J. Key stages in mammary gland development - The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 2, 2006.

OAKLEY, B. R. An abundance of tubulins. **Cell Biology**, v. 10, p. 537-542, 2010.

O'CONNOR, C. M.; ADAMS, J. U. **Essentials of Cell Biology**. Cambridge, MA: NPG Education, 2010. Disponível em: < <http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/contents>>. Acesso em: 09/01/2015.

OHI, Y.; UMEKITA, Y.; YOSHIOKA, T.; SOUDA, M.; RAI, Y.; SAGARA, Y.; SAGARA, Y.; SAGARA, Y.; TANIMOTO, A. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. **Histopathology**, v. 59, p. 776-780, 2011.

OLDENBURG, R. A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C. J.; DEVILLE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, n. 2, p. 125-149, 2007.

OWENS, R. J.; NETTLESHIP, J. E. **Functional and Structural Proteomics of Glycoproteins**. Springer Science & Business Media. 2010.

PAGE, M. J.; AMESS, B.; TOWNSEND, R. R.; PAREKH, R.; HERATH, A.; BRUSTEN, L.; ZVELEBIL, M. J.; STEIN, R. C.; WATERFIELD, M. D.; DAVIES, S. C.; O'HARE, M. J. Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. **Cell Biology**, v. 96, n. 22, p. 12589-12594, 1999.

PAWLIK, T. M.; HAWKE, D. H.; LIU, Y.; KRISHNAMURTHY, S.; FRITSCH, H.; HUNT, K. K.; KUERER, H. M. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. **BMC Cancer**, v. 6, n. 68, 2006.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; de RIJN, M. V.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LONNING, P. E.; BORRESENDALE, A.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 117, n. 11, p. 3155- 3163, 2007.

POLIAK, K.; KALLURI, R. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, vol. 2, p. 1-14, 2010.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J. I.; HE, X.; PEROU, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, 2010.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A.; MINAFRA, S. Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. **Proteomics**, v. 6, p. 2609-2625, 2006.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; MARABETI, M. R.; ALBANESE, N. N.; Di CARA, G.; TAORMINA, P.; MARRAZZO, A. Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and non-tumoral adjacent counterparts. **Proteomics Clinical Applications**, v. 1, n. 1, p. 118-129, 2007.

QIN, Z., KREPLAK, L., BUEHLER, M. J. Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

QIN, X.; LING, B. X. Proteomic studies in breast cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 3, p. 735-743, 2012.

RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S. Functional characterization of acetylated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) kernel globulin. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n. 24, v. 1 , p. 134-138, 2004.

RAGHU, P.; SIVAKUMAR, B. Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1703, n. 1, p. 1-9, 2004.

RAVAL, G. N.; BHARADWAJ, S.; LEVINE, E. A.; WILLINGHAM, M. C.; GEARY, R. L.; KUTE, T.; PRASAD, G. L. Loss of expression of tropomyosin-1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. **Oncogene**, v. 22, p. 6194-6203, 2003.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression. Profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**, v. 378, p. 1812-1823, 2011.

SÆKMOSE, S. G.; SCHLOSSER, A.; HOLST, R.; JOHANSSON, S. L.; WULF-JOHANSSON, H.; TORNØE, I.; VESTBO, J.; KYVIK, K. O.; HOLMSKOV, U.; SØRENSEN, G. L. Enzyme-linked immunosorbent assay characterization of basal variation and heritability of systemic microfibrillar-associated protein 4. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.

SAUTER, E. R.; ZHU, W.; WASSELL, R. P.; CHERVONEVA, I.; Du BOIS, G. C. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid to detect biologic markers of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 86, p. 1440-1443, 2002.

SINN, H.; KREIPE, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care**, v. 8, n. 2, p. 149-154, 2013.

SLEDZINSKI, T.; KORCZYNSKA, J.; GOYKE, E.; STEFANIAK, T.; PROCZKO-MARKUSZEWSKA, M. KASKA, L.; SWIERCZYNSKI, J. Association between cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human subcutaneous adipose tissue and BMI. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 300-309, 2013.

SOMIARI, R. I.; SOMIARI, S.; RUSSELL, S.; SHRIVER, C. D. Proteomics of breast carcinoma. **Journal of Chromatography B**, v. 815, n. 1/2, p. 215-225, 2005.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; de RIJN, M. V.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P. E.; BORRESEN-DALE, A. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C. M.; LONNING, P. E.; BROWN, P. O.; BORRESEN-DALE, A.; BOTSTEIN, D. Repeated

observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

SOUZA, L. E. R. **Caracterização da interação entre a Rho GTPase de baixa massa molecular Rnd1 e a proteína STI1: possíveis implicações biológicas no desenvolvimento do sistema nervoso**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

SRIVASTAVA, S.; GOPAL-SRIVASTAVA, R. Biomarkers in Cancer Screening: A Public Health Perspective. **The Journal of Nutrition**, p. 2471S- 2475S, 2002.

STERNLICHT, M. D.; SUNNARBORG, S. W.; KOUROS-MEHR, H.; YU, Y.; LEE, D. C.; WERB, Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. **Development**, v. 132, p. 3923-3933, 2005.

TASHEVA, E. S.; KOESTER, A.; PAULSEN, A. Q.; GARRETT, A. S.; BOYLE, D. L.; DAVIDSON, H. J.; SONG, M.; FOX, N.; CONRAD, G. W. Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. **Molecular Vision**, v. 8, p. 407-415, 2002.

TAVASSOLI F.A., DEVILEE P. Tumors of the breast. In: \_\_\_\_\_. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. Lyon: IARC Press, 2003, p. 9-112.

THONGWATCHARA, P.; PROMWIKORN, W.; SRISOMSAP, C.; CHOKCHAICHAMNANKIT, D.; BOONYAPHIPHAT, P.; THONGSUKSAI, P. Differential protein expression in primary breast cancer and matched axillary node metastasis. **Oncology Reports**, v. 26, n. 1, p. 185-191, 2011.

TLSTY, T. D.; CRAWFORD, Y. G.; HOLST, C. R.; FORDYCE, C. A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M. L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 263-274, 2004.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIÈRE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; LE BOURHIS, X. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 1239-1247, 2007.

UNIPROT: Universal Protein Resource. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 18/02/2015.

VAN GENT, D.; SHARP, P.; MORGAN, K.; KALSHEKER, N. Serpins: structure, function and molecular evolution. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 11, p 1536-1547, 2003.

VAN IMPE, K.; BETHUYNE, J.; COOL, S.; IMPENS, F.; RUANO-GALLEGO, D.; De WEVER, O.; VANLOO, B.; VAN TROYS, M.; LAMBEIN, K.; BOUCHERIE, C.; MARTENS, E.; ZWAENEPOEL, O.; HASSANZADEH-GHASSABEH, G.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K.; FERNÁNDEZ, L. A.; SANDERS, N. N.; GETTEMANS, J. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, 2013.

VAN KEYMEULEN, A.; ROCHA, A. S.; OUSSET, M.; BECK, B.; BOUVENCOURT, G.; ROCK, J.; SHARMA, N.; DEKONINCK, S.; BLANPAIN, C. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. **Nature**, v. 479, p. 189-193, 2011.

VISVADER, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 23, p. 2563-2577, 2009.

VUONG, D.; SIMPSON, P. T.; GREEN, B.; CUMMINGS, M. C.; LAKHANI, S. R. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv: an International Journal of pathology**, v. 1, p. 1-14, 2014.

WANG, Y.; KURAMITSU, Y.; UENO, T.; SUZUKI, N.; YOSHINO, S.; IIZUKA, N.; AKADA, J.; KITAWAGA, T.; OKA, M.; NAKAMURA, K. Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. **Anticancer Research**, v. 32, p. 3219-3222, 2012.

WATSON, C. J. Key stages in mammary gland development - Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. **Breast Cancer Research**, v.8, n. 2, 2006.

WEISEL, J. H. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 247-299, 2005.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830-838, 1996.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1699, n. 1-2, p. 35-44, 2004.

WULF-JOHANSSON, H. JOHANSSON, S. L.; SCHLOSSER, A.; HOLM, A. T.; RASMUSSEN, L. M.; MICKLEY, H.; DIEDERICHSEN, A. C. P.; MUNKHOLM, H.; POULSEN, S.; TORNØE, I.; NIELSEN, V.; MARCUSSEN, N.; VESTBO, J.; SÆKMOSE, G.; HOLMSKOV, U.; SORESENSEN, G. L. Localization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP 4) in human tissues: clinical evaluation of serum MFAP4 and its associated with various cardiovascular conditions. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.

WULFKUHLE, J. D.; LIOTTA, L. A.; PETRICON, E. F. Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews – Cancer**, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2003.

YANG, W.; DIAMOND, A. M. Selenium-binding protein 1 as a tumor suppressor and a prognostic indicator of clinical outcome. **Biomarker Research**, v. 1, n. 1, 2013.

YAO, D.; DAI, C.; PENG, S. Mechanism of the mesenchymal–epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 1608-1620, 2011.

ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; LINDNER, D.; TALLANT, T. C.; WANG, Z.; BUFFA, J.; KLIPFELL, E.; PARKER, Y.; HATALA, D.; PARSONS-WINGERTER, P.; RAYMAN, P.; YUSUFISHAQ, M. S. S.; FISHER, E. A.; SMITH, J. D.; FINKE, J.; DIDONATO, J. A.; HAZEN, S. L. The cardioprotective protein apolipoprotein a1 promotes potent anti-tumorigenic effects. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 29, p. 21237–21252, 2013.

ZARETSKY, J. Z.; WRESCHNER, D. H. Protein multifunctionality: Principles and mechanisms. **Translational Oncogenomics**, v. 3, p. 99-136, 2008.

ZENG, C.; KE, Z.; SONG, Y.; YAO, Y.; HU, X.; ZHANG, M.; LI, H.; YIN, J. Annexin A3 is associated with a poor prognosis in breast cancer and participates in the modulation of apoptosis in vitro by affecting the Bcl-2/Bax balance. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, p. 23-31, 2013.



ZHANG, D.; RICHARDSON, D. R. Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): An emerging role in cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 1, p. 33-36, 2011.

ZHANG, S.; LE, F.; YOUNES, M.; LIU, H.; CHEN, C.; YAO, Q. Reduced Selenium-Binding Protein 1 in Breast Cancer Correlates with Poor Survival and Resistance to the AntiProliferative Effects of Selenium. **PLoS One**, v. 8, n. 5, 2013.

ZHENG, R.; WANG, J.; WU, Q.; WANG, Z.; OU, Y.; MA, L.; WANG, M.; WANG1, J.; YANG, Y. Expression of ALDH1 and TGF $\beta$ 2 in benign and malignant breast tumors and their prognostic implications. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 7, p. 4137-4183, 2014.

ZHU, J.; XIONG, G.; TRINKLE, C.; XU, REN. Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression. **Histology and Histopathology – Cellular and Molecular Biology**, v. 29, p. 1083-1092, 2014.

ZORATTI, G. L.; TANABE, L. M.; VARELA, F. A.; MURRAY, A. S.; BERGUM, C.; COLOMBO, E.; LANG, J. E.; MOLINOLO, A. A.; LEDUC, R.; MARSAULT, E.; BOERNER, J.; LIST, K. Targeting matriptase in breast cancer abrogates tumour progression via impairment of stromal-epithelial growth factor signaling. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

## APÊNDICE

APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES SOBRE OS GENES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS .....	116
APÊNDICE 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO POR MS/MS.....	118

APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES SOBRE OS GENES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS (continua)

Proteína (SIGLA)	Código UniprotKB	Gene	Locus gênico
Actina aórtica do músculo liso (ACTA)	P62736	<i>ACTA2</i>	10q23.3
Actina citoplasmática 1 (ACTB)	P60709	<i>ACTB</i>	7q22
Actina do músculo cardíaco alfa-1 (ACTC)	P68032	<i>ACTC1</i>	15q14
Actina citoplasmática 2 (ACTG)	P63261	<i>ACTG1</i>	17q25
Actina do músculo liso gama-entérica (ACTH)	P63267	<i>ACTG2</i>	2p13.1
Adenosilhomocisteinase (SAHH)	P23526	<i>AHCY</i>	20q11.22
Aldeído desidrogenase citosólica (AL1A1)	P00352	<i>ALDH1A1</i>	9q21.13
Alfa-1- antitripsina (A1AT)	P01009	<i>SERPINA1</i>	14q32.1
Anexina A1 (ANXA1)	P04083	<i>ANXA1</i>	9q21.13
Anexina A3 (ANXA3)	P12429	<i>ANXA3</i>	4q21.21
Antitrombina III (ANT3)	P01008	<i>SERPINC1</i>	1q25.1
Apolipoproteína A-I (APOA1)	P02647	<i>APOA1</i>	11q23-q24
ATP sintase subunidade beta (ATPB)	P06576	<i>ATP5B</i>	12q13.13
Cadeia beta do fibrinogênio (FIBB)	P02675	<i>FGB</i>	4q28
Cadeia gama do fibrinogênio (FIBG)	P02679	<i>FGG</i>	4q28
Colágeno VI cadeia alfa-1 (CO6A1)	P12109	<i>COL6A1</i>	21q22.3
Complemento C3 (CO3)	P01024	<i>C3</i>	19p13.3-p13.2
Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QRC1)	P31930	<i>UQCRC1</i>	3p21.3
Componente amilóide P do soro (SAMP)	P02743	<i>APCS</i>	1q21-q23
Enolase-alfa (ENOA)	P06733	<i>ENO1</i>	1p36.2
Glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática NAD <sup>+</sup> (GPDA)	P21695	<i>GPD1</i>	12q13.12
Glicoproteína alfa-1B (A1BG)	P04217	<i>A1BG</i>	19q13.4
Glicoproteína alfa-2HS (FETUA)	P02765	<i>AHSG</i>	3q27
Glicoproteína 4 associada à microfibrila (MFAP4)	P55083	<i>MFAP4</i>	17p11.2
Glutaciona peroxidase 3 (GPX3)	P22352	<i>GPX3</i>	5q33.1
Glutaciona S-transferase Mu 3 (GSTM3)	P21266	<i>GSTM3</i>	1p13.3
Glutaciona S-transferase P (GSTP1)	P09211	<i>GSTP1</i>	11q13
Haptoglobina (HPT)	P00738	<i>HP</i>	16q22.2
Hemopexina (HEMO)	P02790	<i>HPX</i>	11p15.5-p15.4
Inibidores de dissociação Rab/GDP beta (GDIB)	P50395	<i>GDI2</i>	10p15
Inibidor de ribonuclease (RINI)	P13489	<i>RNH1</i>	11p15.5
Lactoilglutaciona liase (LGUL)	Q04760	<i>GLO1</i>	6p21.3-p21.1
Mimecan (MIME)	P20774	<i>OGN</i>	9q22
Peroxirredoxina 2 (PRDX2)	P32119	<i>PRDX2</i>	19p13.2

APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES SOBRE OS GENES CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS (conclusão)

Proteína (SIGLA)	Código <i>UniprotKB</i>	Gene	<i>Locus</i> gênico
Peroxirredoxina 3 (PRDX3)	P30048	<i>PRDX3</i>	10q25-q26
Peroxirredoxina-4 (PRDX4)	Q13162	<i>PRDX4</i>	Xp22.11
Peroxirredoxina-6 (PRDX6)	P30041	<i>PRDX6</i>	1q25.1
Pirofosfatase inorgânica (YPIR)	Q15181	<i>PPA1</i>	10q11.1-q24
Proteína 14-3-3 beta/alfa (1433B)	P31946	<i>YWHAB</i>	20q13.1
Proteína 14-3-3 épsilon (1433E)	P62258	<i>YWHAE</i>	17p13.3
Proteína de canal de cloreto intracelular tipo I (CLIC1)	O00299	<i>CLIC1</i>	6p21.3
Proteína dissulfeto isomerase A1 (PDIA1)	P07237	<i>P4HB</i>	17q25
Proteína dissulfeto isomerase A3 (PDIA3)	P30101	<i>PDIA3</i>	15q15
Proteína DJ-1 (PARK7)	Q99497	<i>PARK7</i>	1p36.23
Proteína <i>heat shock</i> de 60kDa mitocondrial (HSP60)	P10809	<i>HSPD1</i>	2q33.1
Proteína <i>heat shock</i> de 27 kDa (HSPB1)	P04792	<i>HSPB1</i>	7q11.23
Proteína de ligação a Ran, do tipo III (RNB3L)	Q86VV4	<i>RANBP3L</i>	5p13.2
Proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4)	P02753	<i>RBP4</i>	10q23.33
Proteína de ligação ao selênio 1 (SBP1)	Q13228	<i>SELENBP1</i>	1q21.3
Proteína de ligação à vitamina D (VTDB)	P02774	<i>GC</i>	4q12-q13
Proteína reguladora de actina (CAPG)	P40121	<i>CAPG</i>	2p11.2
Proteína do retículo endoplasmático 29 (ERP29)	P30040	<i>ERP29</i>	12q24.13
Proteína ribossomal 40S (RSSA)	P08865	<i>RPSA</i>	3q22.2
Queratina do citoesqueleto tipo I - 10 (K1C10)	P13645	<i>KRT10</i>	17q21
Queratina do citoesqueleto tipo I - 14 (K1C14)	P02533	<i>KRT14</i>	17q21.2
Queratina do citoesqueleto tipo I - 18 (K1C18)	P05783	<i>KRT18</i>	12q13
Queratina do citoesqueleto tipo I - 19 (K1C19)	P08727	<i>KRT19</i>	17q21.2
Queratina do citoesqueleto tipo II - 7 (K2C7)	P08729	<i>KRT7</i>	12q13.13
Queratina do citoesqueleto tipo II - 8 (K2C8)	P05787	<i>KRT8</i>	12q13
Sorotransferrina (TRFE)	P02787	<i>TF</i>	3q22.1
Transtirretina (TTHY)	P02766	<i>TTR</i>	18q12.1
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	P09493	<i>TPM1</i>	15q22.1
Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4)	P67936	<i>TPM4</i>	19p13.1
Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A)	Q71U36	<i>TUBA1A</i>	12q13.12
Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B)	P68363	<i>TUBA1B</i>	12q13.12
Tubulina cadeia beta-5 (TBB5)	P07437	<i>TUBB</i>	6p21.33
Vimentina (VIME)	P08670	<i>VIM</i>	10p13

FONTE: O autor (2015)

APÊNDICE 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO POR MS/MS (continua)

Proteína	Identificação no gel	Pico observado	Score limite	Score de identificação	MMr teórica	MMr observada	Erro (ppm)	Sítio de clivagem perdido	Expect	Rank	Peptídeo
K1C19	7	850,4810	27	44	849,4737	849,4497	28,3	0	0,0011	1	R.FGPGVAFR.A
		1674,7910	25/26	56	1673,7837	1673,7685	9,07	0	6,40E-05	1	R.DYSHYYTTIQDLR.D
ACTH	14	1130,4750	24/27	49	1129,4677	1129,5404	-64,3	0	0,0003	1	R.GYSFVTTAER.E
TPM1	16	1314,6370	29	61	1313,6297	1313,7554	-95,7	0	3,40E-05	1	R.KLVIIESDLER.A
TPM4	17	1614,6930	23	73	1613,6857	1613,7645	-48,8	0	4,80E-07	1	K.IQALQQQADEAEDR.A
		1742,7910	24/25	33	1741,7837	1741,8595	-43,5	1	0,0088	1	R.KIQALQQQADEAEDR.A
VIME	21	1093,5030	26	29	1092,4958	1092,52	-22,1	0	0,032	1	K.FADLSEAANR.N
		1323,6160	20/26	46	1322,6087	1322,6102	-1,14	0	0,00056	1	R.EEAENTLQSFR.Q
	26	1570,8800	24/25	49	1569,8727	1569,8878	-9,63	0	0,00025	1	R.ISLPLPNFSSLNLR.E
	27	1323,5270	24/25	41	1322,5197	1322,6102	-68,4	0	0,0014	1	R.EEAENTLQSFR.Q
CAPG	28	1351,7340	28/29	44	1350,7267	1350,6204	78,7	0	0,0017	1	K.YQEGGVESAFHK.T
		1389,8460	26/27	43	1388,8386	1388,7412	70,2	0	0,0014	1	R.QAALQVAEGFISR.M
HEMO	34	1142,6570	25/27	31	1141,6497	1141,6244	22,2	0	0,022	1	R.QGHNSVFLIK.G
		1712,9260	28	104	1711,9187	1711,7624	91,3	0	1,30E-09	1	R.GECQAEGVLFFQGDR.E
	35	1220,6820	26/29	58	1219,6747	1219,5986	62,4	0	7,80E-05	1	K.NFPSPVDAAFR.Q
		1712,8740	28	64	1711,8667	1711,7624	60,9	0	1,40E-05	1	R.GECQAEGVLFFQGDR.E
ANT3	36	1528,8860	22/27	43	1527,8787	1527,7358	93,6	0	0,0016	1	R.FATTFYQHLADSK.N
A1AT	39	1216,5930	25/28	26	1215,5857	1215,5924	-5,49	0	0,073	1	R.IAEFAFEYAR.N
		1641,8480	20/27	56	1640,8407	1640,8562	-9,44	0	7,00E-05	1	K.ITPNLAEFAFSLYR.Q

APÊNDICE 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO POR MS/MS (continuação)

Proteína	Identificação no gel	Pico observado	Score limite	Score de identificação	MMr teórica	MMr observada	Erro (ppm)	Sítio de clivagem perdido	Expect	Rank	Peptídeo
A1AT	42	1641,8690	23/27	40	1640,8617	1640,8562	3,36	0	0,0024	1	K.ITPNLAIEFAFSLYR.Q
	43	1641,9770	17/26	50	1640,9698	1640,8562	69,2	0	0,00021	1	K.ITPNLAIEFAFSLYR.Q
FIBB	49	1239,5970	29	72	1238,5897	1238,5105	64	0	2,80E-06	1	K.EDGGGWYNYR.C
		1668,7750	23/26	49	1667,7677	1667,7079	35,9	0	0,00027	1	R.YYWGGQYTWDMAK.H
RINI	53	1630,8330	27	37	1629,8257	1629,7958	18,4	0	0,0068	1	K.ELTVSNNDINEAGVR.V
HPT	56	980,4750	27	46	979,4677	979,4876	-20,3	0	0,00074	1	R.VGYVSGWGR.N
	58	1707,8050	19/26	48	1706,7978	1706,812	-8,31	0	0,00042	1	K.YVMLPVADQDQCIR.H
GPDA	69	1556,9370	26	49	1555,9297	1555,8107	76,5	0	0,00027	1	K.IVGGNAAQLAQFDPR.V
PRDX3	77	1206,5730	29	47	1205,5657	1205,6517	-71,3	0	0,00085	1	K.HLSVNDLPVGR.S
		1462,7810	26/28	54	1461,7737	1461,7827	-6,16	0	0,00013	1	R.DYGVLLLEGSLALR.G
PRDX2	78	1211,7710	25	85	1210,7637	1210,667	79,9	0	5,60E-08	1	R.QITVNDLPVGR.S
		1735,0980	22	110	1734,0907	1733,9676	71	0	9,00E-11	1	K.EGGLGPLNIPLADVTR.R
PDIA3	82	1515,8970	22/27	44	1514,8897	1514,7518	91,1	1	0,00099	1	R.FLQDYFDGNLKR.Y
HSP60	83	1685,0100	26	108	1684,0027	1683,8978	62,3	0	3,20E-10	1	R.AAVEEGIVLGGGALLR.C
		1919,2010	22	94	1918,1937	1918,0636	67,9	0	3,30E-09	1	K.ISSIQSIVPALEIANAHR.K
HSPB1	84	1783,9640	25/26	72	1782,9567	1782,9152	23,3	0	1,20E-06	1	R.VSLDVNHFAPELTVK.T
CO6A1	98	1775,0060	23	49	1773,9987	1773,9122	48,8	0	0,00016	1	R.VAVVQYSGTGQQRPER.A

APÊNDICE 2 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO TECIDO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E DADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO POR MS/MS (conclusão)

Proteína	Identificação no gel	Pico observado	Score limite	Score de identificação	MMr teórica	MMr observada	Erro (ppm)	Sítio de clivagem perdido	Expect	Rank	Peptídeo
CO6A1	100	1580,9270	26	67	1579,9197	1579,8358	53,1	0	4,40E-06	1	K.VFSVAITPDHLEPR.L
		1757,8880	21/27	79	1756,8806	1756,8056	42,7	0	3,40E-07	1	K.TAEYDVAYGESHLFR.V
	101	1580,9410	20/26	40	1579,9337	1579,8358	62	0	0,0019	1	K.VFSVAITPDHLEPR.L
		1757,9080	28	83	1756,9007	1756,8056	54,1	0	1,70E-07	1	K.TAEYDVAYGESHLFR.V
A1BG	102	1372,8260	27	50	1371,8187	1371,6895	94,2	0	0,00031	1	K.HQFLLTGDTQGR.Y
		1724,0650	16/24	30	1723,0576	1722,9529	60,8	0	0,013	1	R.LELHVDGPPRPQLR.A
	103	1372,7160	25/28	53	1371,7086	1371,6895	13,9	0	0,00015	1	K.HQFLLTGDTQGR.Y
FETUA	105	1660,7910	16/26	59	1659,7837	1659,7563	16,5	0	3,20E-05	1	K.EHAVEGDCDFQLLK.L
		2081,0700	17/26	45	2080,0628	2080,016	22,5	0	0,00081	1	R.HTFMGVVSLGSPSGEVSH PR.K
CO3	108	1842,1340	24	74	1841,1267	1840,9836	77,8	0	5,10E-07	1	K.VHQYFNVELIQPGAVK.V

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: **MMr** – Massa Molecular relativa; **ppm** – partes por milhão.

# PROTEOME OF CONTRALATERAL NON-TUMOR BREAST TISSUE AND COMPARISON WITH THE CORRESPONDENT PRIMARY TUMOR

TALITA HELEN BOMBARDELLI GOMIG<sup>1</sup>, GUSTAVO GÓES DA COSTA<sup>1</sup>,  
TAYANA SCHULTZ JUCOSKI<sup>1</sup>, CAROLINE KUKOLJ<sup>2</sup>,  
CICERO DE ANDRADE URBAN<sup>3</sup>, RUBENS SILVEIRA DE LIMA<sup>3</sup>,  
LUCIANE REGINA CAVALLI<sup>4</sup>; ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO<sup>1</sup>  
and IGLENIR JOÃO CAVALLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Genetics Department and <sup>2</sup> Biochemistry Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil;

<sup>3</sup> Breast Unit, Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Brazil;

<sup>4</sup> Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington DC;

## Abstract

**Background:** Protein alterations in the human mammary gland may predispose to diseases, including breast cancer. The establishment of the protein profile of the non-tumor tissue is important to characterize the healthy breast and to understand the changes related to cancer. The main objective of this study was to describe the proteins expressed by the contralateral breast tissue (CBT), comparing with the ipsilateral tissue (personal databank) and some correspondent primary tumors. **Materials and Methods:** Eight patients diagnosed with invasive ductal carcinoma (IDC) were included in this study. 2D-PAGE and MALDI-TOF/MS were used to identify the proteins. **Results:** In CBT 110 spots were identified, corresponding to 62 distinct proteins. Great similarity was seen as comparisons were made with the ipsilateral tissue. Compared to tumor, ENOA, K2C8, SBP1, ANXA1, GPDA and GSTP1 presented differential expression. **Conclusion:** This study describes the main proteins expressed by CBT and indicates relevant targets that may play a role in mammary tumorigenesis.

**Key Words:** contralateral non-tumor breast tissue, breast cancer, proteome, 2D-PAGE, MALDI-TOF.

**Abbreviations:** CBT: Contralateral non-tumor breast tissue; IBT: ipsilateral non-tumor breast tissue; TBT: tumor breast tissue; IDC: invasive ductal carcinoma; 2D-PAGE: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight; MS: mass spectrometry; P: patient; PMF: peptide mass fingerprinting; MM: molecular mass; pI: isoelectric point; PTM: post-translational modifications.

**Correspondence to:** Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética - Caixa Postal 19071, Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, CEP: 81531-990 - Curitiba/Paraná, Brazil. Tel: +55 4133611555, e-mail: eribeiro@ufpr.br



## Introduction

The mammary gland consists in a complex structure whose maintenance and functionality depends on interconnected signaling networks. Different cell types interact to the development and homeostasis maintenance of the breast. Such complexity is relevant to breast diseases.

Abnormalities in cell-cell and cell-microenvironment interactions can be important in mammary tumorigenesis (1). Breast cancer is a complex disease that results from the accumulation of genetic/epigenetic alterations, and consequently changes in gene expression patterns (2). In this process, protein action in various signaling pathways may be altered and promotes proliferation, differentiation, changes in immunity, invasion, metastasis or inhibit apoptosis (3), providing “immortality” to abnormal cells. Complex protein networks regulate these cellular processes through multiple interconnections of activity, while abnormalities can theoretically interfere with the flow of downstream information (4).

To understand the abnormal behavior of cells and their proteins in the pathological state, it is necessary to identify proteins and biological processes that occur in non-tumor breast tissue. Proteomics methods have been widely employed to investigate the protein expression profiles of various cell types and tissues, including breast (5). In clinical proteomics, the efforts are directed at proteins involved in pathological processes, such as cancer (6-9) and to investigate differences in protein or peptide expressions in biofluids and tissues from controls and patients (10-12).

Among the proteomics tools, the mass spectrometry (MS) is an analytical instrument often combined with 2D-PAGE for protein separation and identification (13). In breast cancer, the MALDI-TOF/MS technology can identify profiles of proteins and peptides at high sensibility and also present diagnostic, therapeutic and prognostic applications (13-16).

In this study, 2D-PAGE and MALDI-TOF/MS were performed to investigate the protein content of the contralateral non-tumor breast tissue (CBT) comparing it with the correspondent primary breast tumor in three patients. Studies using non-tumor tissue from the same breast where the tumor is located (ipsilateral breast tissue – IBT) were described by our group (5, 17, 18) compounding a data base; another objective of this study was to compare CBT and IBT samples and conclude whether both tissues can really be considered as “normal” and used as a control in comparative studies.

## Materials and Methods

*Patients.* Eight patients (P1-P8) from Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, Brazil), diagnosed with invasive ductal carcinoma (IDC) were included in this study. The mean age was  $51.5 \pm 9.8$  years. CBT samples were collected during the surgery procedure. Three patients (P4, P7 and P8) also allowed the collection of the primary tumor to perform the comparative analysis. The study was approved by the National Commission of Ethics in Human Research (CONEP number 7220), and all patients signed an informed consent. Table 1 shows patient's information.

Table I. *Patient's clinical and immunohistochemical data*

Patient code	Age	Tumor grade	ER	PR	HER2	Ki67
P1	59	II	Positive	Negative	Negative	30-40%
P2	40	III	-	-	-	-
P3	65	I	-	-	-	-
P4	50	II	Positive	Positive	Negative	30%
P5	63	III	Positive	Positive	Positive	10%
P6	44	II	Positive	Positive	Positive	25%
P7	41	II	Negative	Negative	Negative	50%
P8	50	I	Positive	Positive	Negative	40%

ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; Ki67, antigen Ki67

*Protein extraction.* Breast tissue fragments were solubilized in lysis solution (7 M urea, 2 M thiourea, 40 mM Tris, 40 mM DTT, 4% CHAPS and 0.2% PMSF), with an electric grinder. The samples were sonicated for 7 times of 5 seconds on ice, intercalated by 1 minute, using a Fisher 150T sonating probe (Fisher Scientific). The total lysate was centrifuged at  $15,300 \times g$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to clear debris. Protein concentration was measured by the Bradford assay (19).

*Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.* The 2D-PAGE was performed according to the manufacturer's recommendations (20). The first-dimensional separation was performed with IPG strips (immobilized pH gel) pH 4-7 (130x3x0.5mm, GE Healthcare, Milwaukee, USA) previously rehydrated for 18h, at room temperature, with 1000  $\mu\text{g}$  of protein and rehydration buffer composed of 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG and 50 mM DTT. The isoelectric focusing was performed on the Ettan IPGphor electrophoresis system II (GE Healthcare, Milwaukee, USA) according to the manufacturer's recommendations. The thiol groups were reduced in a solution containing 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (w/v) glycerol, 2% (w/v)

SDS and traces of bromophenol blue. After, the free thiol groups were alkylated in the same solution with 4.5% iodoacetamide instead of DTT. The focused proteins were separated on a polyacrylamide gel (10%, 18 x 16 cm), in the presence of SDS. The second dimension was performed in the Hoefer Ruby 600 (GE Healthcare, Milwaukee, USA) system electrophoresis at 11°C for 30min at 15 mA and 4.5h at 30 mA. Proteins were fixed in 1.3% ortho-phosphoric acid (85%) and 20% methanol for 1h and staining in solution 0.01% Coomassie G-250, 1.5% of orthophosphoric acid (85%) and 7.7% ammonium sulfate. Gels were produced in a restricted pH range to maximize the protein separation and no depletion method was applied to remove plasma proteins. Spots identified as albumin were not considered in this study.

*Image Analysis.* Gels were scanned with ImageScanner™ II (GE Healthcare, Milwaukee, USA) and analyzed in ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare, Milwaukee, USA). The 2D gel was produced in triplicate and one of these was defined as the most informative for each sample. Then, the most representative of all samples was selected as the master gel and used to perform the following identifications. Spot detection and matching were edited manually. The normalization at ImageMaster™ software was performed considering the logarithmic ratios of spots with precise matching. For comparative analysis, only spots with expression levels above 2 folds were selected for statistical analysis. The Student's *t*-test was used in software to evaluate differential spots ( $p < 0.05$ ).

*Mass spectrometry and protein identification.* Selected spots were excised from the 2D gel and destained, using 50% acetonitrile and 25 mM ammonium bicarbonate; then they were dehydrated in 100% acetonitrile. Reduction of the thiol groups was performed in 1 mM DTT and 25 mM ammonium bicarbonate for 45min at 56°C; then it was alkylated with 55 mM iodoacetamide and 25 mM ammonium bicarbonate, for 30min at room temperature and protected from light. Digestion of the spots was performed in 40 mM ammonium bicarbonate, 10% acetonitrile and 15 ng/μl trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega) at 37°C for 16-20h. The solution containing the peptides was mixed (1:1) with 50% acetonitrile:0.1% TFA, with saturated HCCA matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and applied in plate for MALDI (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). The spectrometer MALDI-TOF/TOF/MS/MS Self Flex II (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) was used to identify the proteins. The spectra were obtained by FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics,

Leipzig, Germany) with a molecular mass range of 700-3200 Da. The internal calibration was performed with ACTH peptides 1-17, ACTH 1-24, 18-39 ACTH, angiotensin I, angiotensin II and somatostatin. The analysis and processing of the MS spectrum was performed in Flex Analysis 2.0 (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). The peptide mass fingerprinting (PMF) was compared with Swiss-Prot database, in the MASCOT platform (<http://www.matrixscience.com/>). The spots were identified with maximum error tolerance of 100 ppm, and the criteria  $\Delta MM < 20\%$  and  $\Delta pI < 0.6$  was used to consider the spots in expected position on the 2D gel (21, 22).

#### *Proteomics lab database analysis.*

The 2D gels were compared with our personal proteomic database, which was established from previous proteomic studies in breast and lymph node tissues. Comparison between the most representative gels (named *master gel*) of CTB and IBT was performed in ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare, Milwaukee, USA), using the same analysis patterns described above.

## **Results**

### **Contralateral non-tumor breast tissue proteome characterization.**

Characterization of the CBT proteome was performed with eight samples in triplicate and results in 110 spots identified by PMF, corresponding to 62 different proteins (Figure 1 and Table II). Most identifications have maximum error tolerance of 100 ppm, and 71.8% of identified spots were according to  $\Delta MM < 20\%$  and  $\Delta pI < 0.6$ . Among the 62 proteins identified, 21 (33.9%) were observed in more than one spot and they correspond to different isoforms of the same protein, with different molecular mass (MM) and isoelectric point values (pI). In this study, collagen VI alpha 1 chain (CO6A1) serotransferrin (TRFE) and alpha-1B glycoprotein (A1BG) showed different MM and pI, and they present a sequential pattern on the 2D gels.

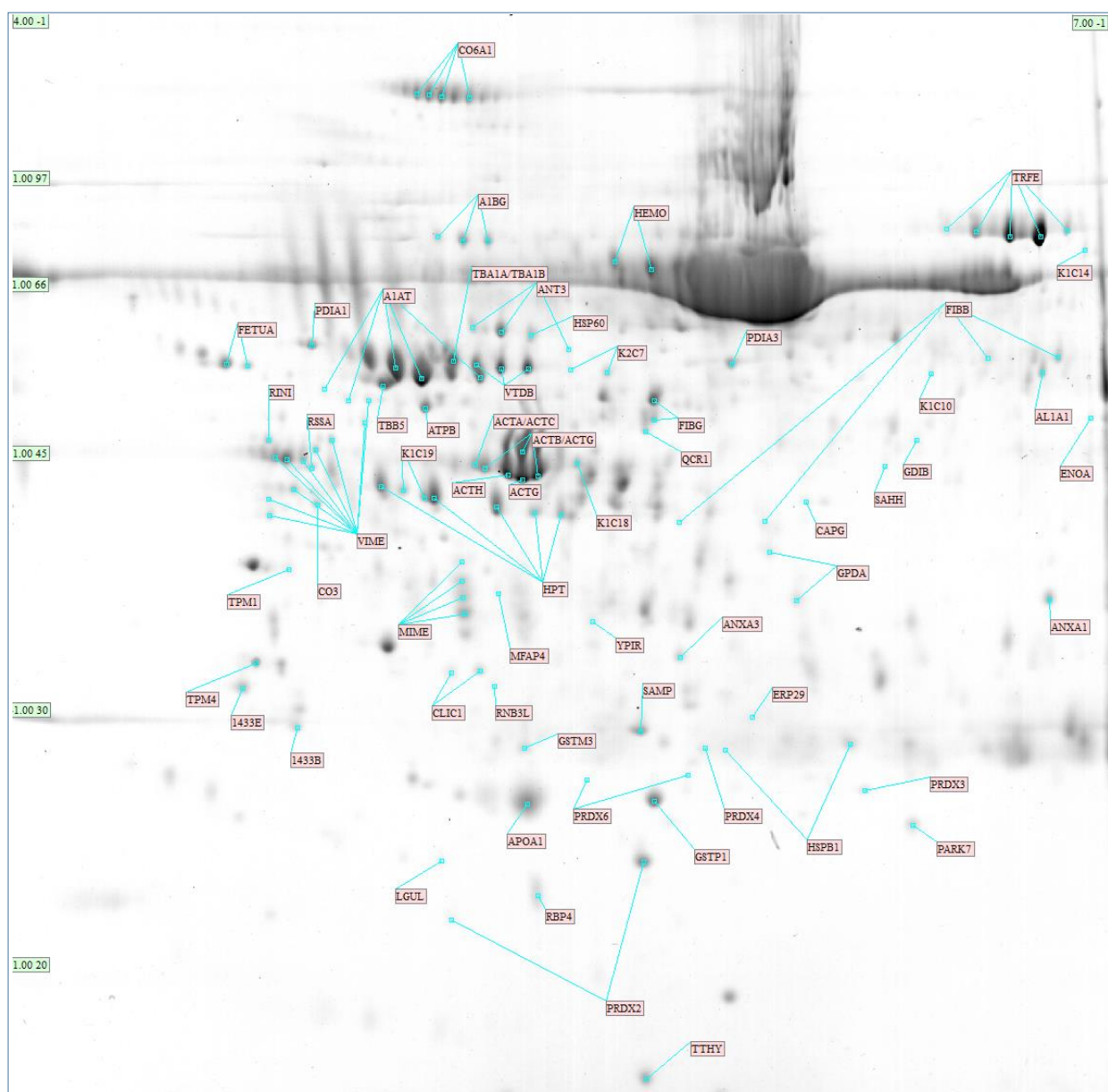


Figure 1 – Reference 2D gel with proteins identified in contralateral non-tumor breast tissue.

Table II. *Proteins identified in contralateral non-tumor breast tissue.*

Protein name (abbreviated name)	Swiss-prot number	Gene (UniGene)	Molecular main functions (UniProtKB)
Keratin, type I cytoskeletal 14 (K1C14)	P02533	KRT14	Keratin filament binding; cytoskeleton constituent
Keratin, type II cytoskeletal 7 (K2C7)	P08729	KRT7	Structural activity
Keratin, type I cytoskeletal 10 (K1C10)	P13645	KRT10	Structural constituent of epidermis
Keratin, type I cytoskeletal 18 (K1C18)	P05783	KRT18	Structural activity; poly(A) RNA binding; scaffold protein binding
Keratin, type I cytoskeletal 19 (K1C19)	P08727	KRT19	Cytoskeleton and muscle constituents
Tubulin alpha-1A chain (TBA1A) Tubulin alpha-1B chain (TBA1B)	Q71U36 P68363	TUBA1A TUBA1B	Cytoskeleton constituent; structural molecule activity; GTPase activity; GTP binding
Tubulin beta chain (TUBB)	P07437	TUBB	Cytoskeleton constituent; structural molecule activity; GTPase activity; GTP binding
Actin, cytoplasmic 1 (ACTB) Actin, cytoplasmic 2 (ACTG)	P60709 P63261	ACTB ACTG	Cytoskeleton constituent; ATP binding; identical protein binding
Actin, aortic smooth muscle (ACTA) Actin, alpha cardiac muscle 1 (ACTC)	P62736 P68032	ACTA2 ACTC1	ATP binding; protein kinase binding (ACTA); myosin binding (ACTC);
Actin, gamma-enteric smooth muscle (ACTH)	P63267	ACTG2	ATP binding
Tropomyosin alpha-1 chain (TPM1)	P09493	TPM1	Actin binding; cytoskeleton protein binding; cytoskeleton and muscle constituents
Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4)	P67936	TPM4	Muscle constituent; calcium ion binding
Vimentin (VIME)	P08670	VIM	Cytoskeleton constituent; scaffold protein binding; identical protein binding; glycoprotein binding; keratin filament binding; double-stranded RNA binding
Macrophage-capping protein (CAPG)	P40121	CAPG	Protein complex binding; protein domain binding
Serotransferrin (TRFE)	P02787	TF	Iron binding; transferrin receptor binding
Hemopexin (HEMO)	P02790	HPX	Heme transporter activity; metal ion binding
Antithrombin-III (ANT3)	P01008	SERPINC1	Heparin binding; protease binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity
Alpha-1-antitrypsin (A1AT)	P01009	SERPINA1	Glycoprotein binding; protease binding; identical protein binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity
Vitamin D-binding protein (VTDB)	P02774	GC	Actin, calcdiol binding; vitamin D binding; vitamin transporter activity
Fibrinogen beta chain (FIBB)	P02675	FGB	Chaperone binding; structural molecule activity
Fibrinogen gamma chain (FIBG)	P02679	FGG	Cell adhesion molecule; metal ion binding; receptor binding; structural molecule activity

Protein name (abbreviated name)	Swiss-prot number	Gene (UniGene)	Molecular main functions (UniProtKB)
Ribonuclease inhibitor (RINI)	P13489	RNH1	Ribonuclease inhibitor activity
Haptoglobin (HPT)	P00738	HP	Hemoglobin binding; antioxidant and serine-type endopeptidase activities
Serum amyloid P-component (SAMP)	P02743	APCS	Calcium ion binding; carbohydrate binding; unfolded protein binding; complement component binding; virion binding
Apolipoprotein A-I (APOA1)	P02647	APOA1	Apolipoprotein receptors binding; cholesterol and phospholipid binding; lipase inhibitor, cholesterol and phospholipid transporter activities
Retinol-binding protein 4 (RBP4)	P02753	RBP4	Retinal and retinol binding; retinol transporter activity
Transthyretin (TTHY)	P02766	TTR	Hormone binding; identical protein binding
Retinal dehydrogenase 1 (AL1A1)	P00352	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase (NAD), retinal dehydrogenase and GTPase activator activities; androgen binding
ATP synthase subunit beta (ATPB)	P06576	ATP5B	ATP binding; MHC class I binding; transporter activity
Alpha-enolase (ENOA)	P06733	ENO1	DNA binding; GTPase binding; poly(A) RNA binding; magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase and transcription corepressor activities
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (QRC1)	P31930	UQCRC1	Zinc ion binding; ubiquitin protein ligase binding; metalloendopeptidase and ubiquinol-cytochrome c reductase activities
Adenosylhomocysteinase (SAHH)	P23526	AHCY	Adenyl nucleotide and NAD binding; Adenosylhomocysteinase activity
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic (GPDA)	P21695	GPD1	NAD binding; glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity
Inorganic pyrophosphatase (YPIR)	Q15181	PPA1	Magnesium ion binding; inorganic diphosphatase activity
Lactoylglutathione lyase (LGUL)	Q04760	GLO1	Zinc ion binding; lactoylglutathione lyase activity
Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3)	P21266	GSTM3	Enzyme binding; glutathione binding; identical protein binding; glutathione transferase and protein homodimerization activities
Glutathione S-transferase P (GSTP1)	P09211	GSTP1	Glutathione binding; nitric oxide binding; S-nitrosoglutathione binding; drug binding; glutathione transferase and kinase regulator activities
Peroxiredoxin-4 (PRDX4)	Q13162	PRDX4	Thioredoxin peroxidase activity
Peroxiredoxin-6 (PRDX6)	P30041	PRDX6	Peroxiredoxin, glutathione peroxidase, phospholipase A2 and antioxidant activities
Peroxiredoxin-3 (PRDX3)	P30048	PRDX3	Thioredoxin peroxidase and alkyl hydroperoxide reductase activities; protein C-terminus binding; kinase binding
Peroxiredoxin-2 (PRDX2)	P32119	PRDX2	Thioredoxin peroxidase and antioxidant activities
Protein deglycase DJ-1 (PARK7)	Q99497	PARK7	Glyoxalase, peroxiredoxin, superoxide dismutase chaperone and transcription coactivator activities; cytokine binding; enzymes binding; mRNA binding; scaffold protein binding

Protein name (abbreviated name)	Swiss-prot number	Gene (UniGene)	Molecular main functions (UniProtKB)
Protein disulfide-isomerase A1 (PDIA1)	P07237	P4HB	Protein disulfite isomerase, protein heterodimerization and endopeptidase activities; integrin binding; poly(A) RNA binding
Protein disulfide-isomerase A3 (PDIA3)	P30101	PDIA3	Protein disulfite isomerase, disulfite oxidoreductase, phospholipase C and endopeptidase activities; poly(A) RNA binding
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP60)	P10809	HSPD1	ATPase activity; DNA replication origin binding; single-stranded DNA binding; double-stranded RNA binding; ATP binding; p53 binding; chaperone binding
Heat shock protein beta-1 (HSPB1)	P04792	HSPB1	Protein kinase C inhibitor activity; poly(A) RNA binding; kinase ubiquitin binding; identical protein binding
Endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERP29)	P30040	ERP29	Protein homodimerization activity; chaperone binding
Mimecan (MIME)	P20774	OGN	Heparin binding
14-3-3 protein epsilon (1433E)	P62258	YWHAZ	Protein heterodimerization and potassium channel regulator activities; ion channel binding; ubiquitin ligase binding; histone deacetylase binding; phosphoprotein binding; enzyme binding
14-3-3 protein beta/alpha (1433B)	P31946	YWHAZ	Transcription corepressor activity; histone deacetylase binding; phosphoprotein binding; protein domain specific binding; enzyme binding
Annexin A1 (ANXA1)	P04083	ANXA1	Structural molecule, phospholipase A2 inhibitor, ATPase, helicase and annealing helicase activities; calcium ion and calcium-dependent protein binding; phospholipid binding; single-stranded DNA/RNA binding
Annexin A3 (ANXA3)	P12429	ANXA3	Phospholipase A2 inhibitor activity; calcium ion and calcium-dependent protein binding
Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1)	O00299	CLIC1	Chloride channel and voltage-gated ion channel activities
40S ribosomal protein SA (RSSA)	P08865	RPSA	Structural constituent of ribosome; laminin receptor and virus receptor activities; poly(A) RNA binding; ribosome binding
Collagen alpha-1(VI) chain (CO6A1)	P12109	COL6A1	Platelet-derived growth factor binding
Alpha-1B-glycoprotein (A1BG)	P04217	A1BG	Unknown
Alpha-2-HS-glycoprotein (FETUA)	P02765	AHSG	Endopeptidase inhibitor and kinase inhibitor activity
Rab GDP dissociation inhibitor beta (GDIB)	P50395	GDI2	Rab GDP-dissociation inhibitor, GTPase activator and oxidoreductase activities; poly(A) RNA binding
Complement C3 (CO3)	P01024	C3	Endopeptidase inhibitor activity; lipid, cofactor and receptor binding
Microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4)	P55083	MFAP4	Calcium-dependent cell adhesion and intercellular interactions
Ran-binding protein 3-like (RNB3L)	Q86VV4	RANBP3L	Intracellular transport



The 62 proteins identified in the CBT were categorized into eight functional classes (Figure 2) based on their major biological functions, as described by Pucci-Minafra and coworkers (23, 24), and in the information obtained in databases UniProtKB/Swiss-Prot and NCBI. The majority comprises cytoskeletal and associated proteins (24.2%), proteins with binding/transport function (21%), metabolic enzymes (12.9%) and detoxification and redox proteins (11.3%). Molecular chaperones/heat shock proteins (8.1%), cell growth and proliferation regulators (4.8%), membrane associated proteins (4.8%) and protein biosynthesis (1.6%) were also observed. A group of proteins not classified in these classes was denominated as “other functions” and corresponded to 11.3% of the total number.

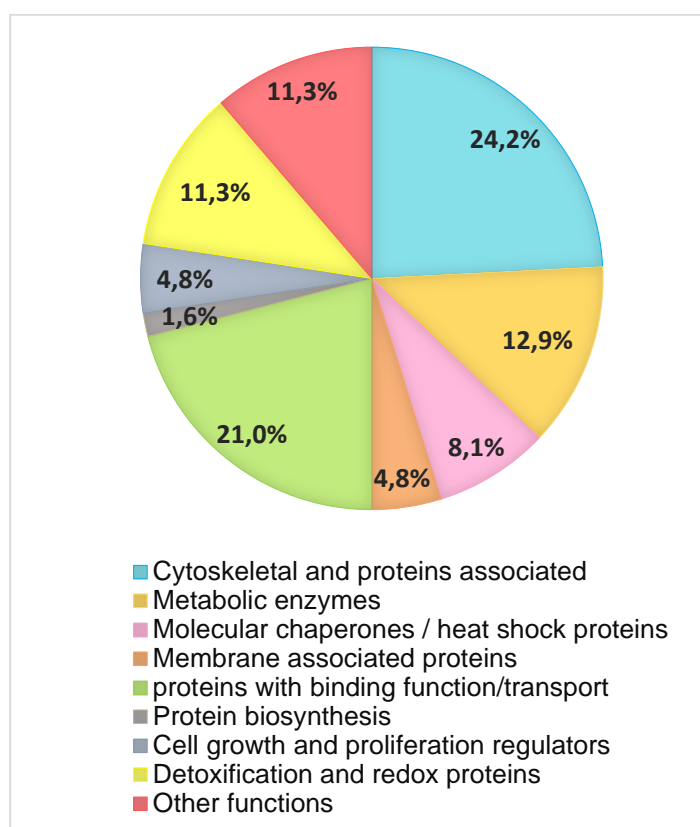


Figure 2. *Functional classification of the identified proteins in the contralateral non-tumor breast tissue.*

**Comparative proteomic analysis.** The comparative analysis of proteins expressed in CBT and matched TBT was performed for patients P4, P7 and P8. Six differentially expressed proteins were identified (Figure 3 and Table III). In most cases, the spots were observed in the expected position in the gel ( $\Delta MM < 20\%$  and  $\Delta pI < 0.6$ ).

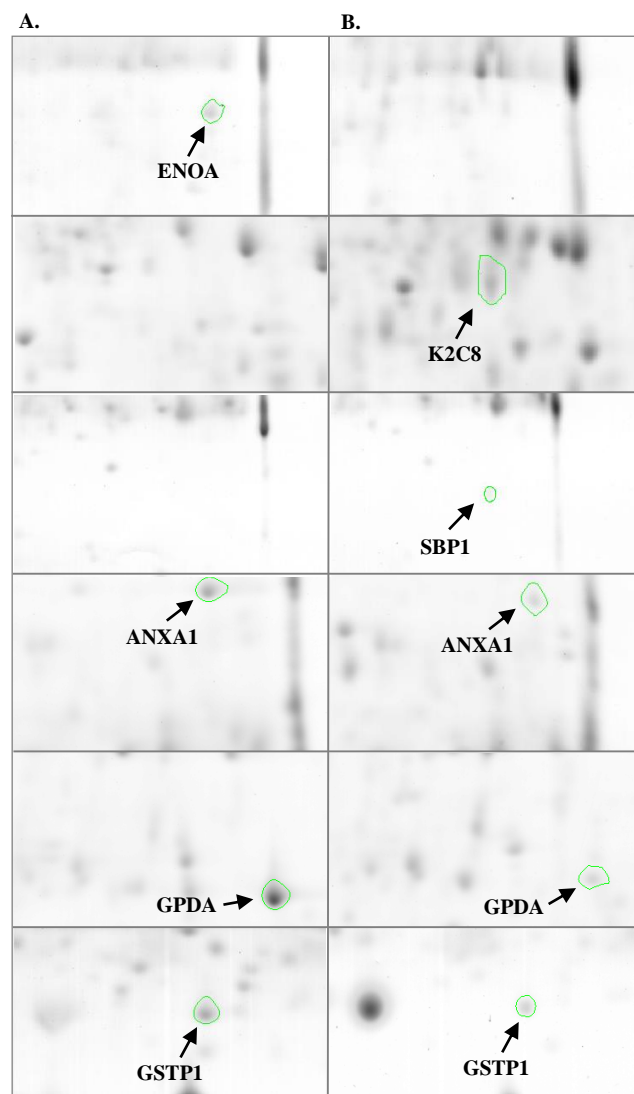


Figure 3. Spots that are differentially expressed between the contralateral breast tissue (A) and the tumor (B).

Table III. Differentially expressed proteins between contralateral non-tumor breast tissue and tumor.

Protein name (abbreviated name)	Swiss-prot number	MASCOT score/ 2° score	Theoretical MM (kDa)/ pI	$\Delta$ MM/ $\Delta$ pI	Sequence coverage	Matched peptides	CTB x TBT
Alpha-enolase (ENOA)	P06733	69 / 33	47,481 / 7,01	1,01% / 0,12	18%	6 / 11	Exclusive CBT
Keratin, type II cytoskeletal 8 (K2C8)	P05787	115 / 45	53,671 / 5,52	19,88% / 0,45	26%	17 / 32	Exclusive TBT
Selenium-binding protein 1 (SBP1)	Q13228	70 / 47	52,928 / 5,93	56,54% / 0,85	24%	6 / 14	Exclusive TBT
Annexin A1 (ANXA1)	P04083	158 / 33	38,918 / 6,57	12,64% / 0,19	37%	10 / 13	Increased in CBT
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic (GPDA)	P21695	197 / 36	38,171 / 5,81	10,93% / 0,23	52%	12 / 18	Increased in CBT
Glutathione S-transferase P (GSTP1)	P09211	105 / 37	23,569 / 5,43	10,31% / 0,35	54%	8 / 24	Increased in CBT

Relevant similarity was observed when contralateral and ipsilateral non-tumor breast tissues were compared. Most of the spots identified in CBT proteome (92.7%) matched with ipsilateral tissue, and 45 of these spots showed the same identity in both tissues. Just one spot was different and absent in the ipsilateral tissue, probably due to difficulties in protein separation and overlapping spots. The remaining 56 spots corresponded to identifications obtained just for CBT, and they had not been listed in our personal proteomic database before.

## Discussion

The mammary gland presents various types of cells, providing heterogeneity to the tissue, and each cell type is subject to a constant turnover (25). This dynamic structure of the breast can interfere in their physiological conditions, consequently affecting the protein expression. Due to alterations that are characteristic of the menstrual cycle and the inherent heterogeneity, it is difficult to determine a reference state of non-tumor breast tissue. However, in order to understand mammary tumorigenesis, deep knowledge of the healthy state of the breast is paramount. In this study, we investigated the proteins expressed in the tissue located in the opposite breast to the tumor (contralateral), comparing the data with our previous information about the ipsilateral tissue. The comparison between contralateral and ipsilateral breast tissue had the main objective to validate the use of both types of tissue as a control in comparative studies, since the contralateral tissue is not a regular sample. Also, we included a comparison with breast tumor tissue in three samples.

**Contralateral breast tissue proteome characterization.** Some proteins present distinct MM and pI values, showing that they had been modified by post-translational modifications (PTM), which may change the properties of the protein (26). These modifications can be detected in 2D gel by changes in vertical and/or horizontal pattern migration of the proteins. The PTMs play key roles in cell biology regulation, determining protein functions, including their activity state, cellular location and dynamic interactions with other proteins (27).

The diversity of biological functions observed with proteomic methods in this study indicated that a wide range of proteins cooperates to drive the functionality and development of the mammary gland. The functional categories approach is important to develop valid techniques for studies about biochemical functions of cells and their

deregulation in cancer (23). However, these categories are subject of future revision due to the multifunctional nature of some proteins.

#### *Cytoskeleton and associated proteins*

Seventeen proteins identified in 30 spots comprise this class. Actins (ACTA, ACTB, ACTC, ACTG and ACTH) and cytokeratins (K1C10, K1C14, K1C18, K1C19, K2C7 and K2C8) were the most abundant. We also observed tubulin (TBA1A, TBA1B and TUBB), tropomyosins (TPM1 and TPM4), vimentin (VIME) and the regulatory protein CAP-G (CAPG).

Cytoskeleton proteins play a role in various cellular processes such as cell division, motility, adhesion, polarity, intracellular traffic and signal transduction (23). Changes in cytoskeleton components with role in carcinogenesis have been described in several studies (24, 28-33).

Actins and tubulins are highly conserved proteins showing great similarity and playing an essential role in eukaryotic cells (23). It is difficult to discriminate actins by PMF resulting in the detection of several forms in the same spot (5, 23). Several proteins interact and bind to actin, regulating its dynamics inside the cell. In breast cancer, CAPG proteins have been found overexpressed, and the highest levels were observed in tumor margins, where cells with invasive capacity are located, suggesting a role in cell motility and tumor spread (34, 35). Seven spots were identified as different cytokeratins – an important group of proteins that comprise the intermediate filaments of cytoskeleton. Differences of cytokeratins expression are widely employed to distinguish epithelial subtypes in the mammary gland. Protein K1C19 is expressed in luminal cells of ducts, K1C18 in luminal cells of alveolus and K1C14 is present in mioepithelial cells (36). Here we identified these three proteins, in addition to K1C10 and K2C7.

#### *Proteins with binding/transport function*

This group comprises thirteen different proteins, identified in 34 spots. The most common proteins have functions related to iron ions recovery, as serotransferrin (TRFE), hemopexin (HEMO) and haptoglobin (HPT), totaling 12 spots. Proteins involved in the regulation of blood coagulation, identified in 14 spots, include antithrombin III (ANT3), alpha-1 antitrypsin (A1AT) and the components of fibrin, as well as beta and gamma chains of fibrinogen (FIBB and FIBG, respectively).

Iron acts as a cofactor of one of the key enzymes of DNA replication – the ribonucleotide reductase (37). Changes in iron metabolism can occur in cancer cells, as in development and progression of breast cancer, altering the expression of proteins related to this function (38). The inhibitors of serine protease, represented by A1AT and ANT3, regulate biological processes such as blood coagulation, complement activation, apoptosis, angiogenesis, inflammation and tumor suppression (39). Fibrinogen acts in proliferative signals induction that promotes cell adhesion responses, proliferation and migration during angiogenesis and tumor growth (40).

Other proteins included in this category display specific functions, including the transport of vitamins (RBP4 and VTDB) or hormones (TTHY); as well as activities related to cholesterol (APOA1); interaction with DNA and histones, suggesting regulatory activity of chromatin (SAMP); and the inhibitory function of ribonucleases (RINI). The involvement in mammary tumorigenesis has been described for VTDB and APOA1 (41-43).

### *Metabolic enzymes*

In this class, nine spots corresponded to the following proteins: ATP synthase beta subunit (ATPB), cytochrome bc 1 complex subunit 1 (QRC1), enolase-alpha (ENOA), adenosylhomocysteinase (SAHH), lyase lactoalglutinationa (LGUL), inorganic pyrophosphatase (YPIR), glycerol-3-phosphate dehydrogenase NAD dependent, cytoplasmic (GPDA) and cytosolic aldehyde dehydrogenase (AL1A1).

ATPB and QRC1 are mitochondrial enzymes that play an important role in the respiratory chain. ENOA is a multifunctional enzyme, and it acts in glycolysis (44). It also has a function as a plasminogen receptor, mediating plasmin activation and extracellular matrix degradation (45). SAHH plays an important role in regulating the methylation reactions in the cell, and it has been described as a tumor suppressor (46). LGUL, also known as glyoxalase I, has functions in methylglyoxal detoxification – a product of glycolysis – and is associated to proliferation and apoptosis in cancer cells. This protein is overexpressed in various tumors, including colon, breast and ovarian cancer (47). In breast cancer, AL1A1 is described in clonal ability and innate chemoresistance, contributing to tumor invasiveness (48), and it makes this enzyme a reliable marker for breast cancer stem cells (49).

### *Detoxification and redox proteins*

Four members of the peroxiredoxin family, namely PRDX2, PRDX3, PRDX4 and PRDX6, two enzymes of the glutathione S-transferase superfamily, GSTM3 and GSTP1, in addition to glutathione peroxidase 3 (GPX3) and DJ-1 protein (PARK7) represent this category.

The reduction/oxidation (redox) control is a key process to maintaining homeostasis (23). Detoxification and redox proteins have important functions in cell catabolism and protection against metabolic stress. Moreover, these proteins can prevent cell damage by acting in xenobiotics detoxification. Peroxiredoxins play an important protective role in the cell, driving several redox-sensitive cell activities (50). In breast cancer, the PRDX members identified in this study are more expressed in tumor tissue compared to healthy conditions, possibly as adaptation to the oxidative stress found in a tumor microenvironment (50, 51).

### *Molecular chaperones and heat shock proteins*

Chaperones and other enzymes assist in the folding of proteins, an important process for acquisition of native functional conformation (52). In this class, we identified protein disulfide isomerase A1 and A3 (PDIA1 and PDIA3, respectively), endoplasmic reticulum protein 29 (ERP29) and mitochondrial heat shock proteins of 60kDa (HSP60) and 27kDa (HSPB1).

Protein disulfide isomerases are molecular chaperones from endoplasmic reticulum, which can introduce disulfide in proteins (oxidase activity) and catalyzes the disulfide rearrangement erroneously (isomerase activity) (52). In the mammary tumorigenesis, these proteins may play a role in the viability of metastatic carcinoma in the lymph node (53). The ERP29 function is related to chaperone activity (54, 55). High levels of ERP29 are observed in actively secreting tissues such as the mammary, salivary and thyroid glands (54) and have been widely involved in epithelial tumorigenesis of some tumors (55).

### *Membrane associated proteins*

The annexins A1 and A3 (ANXA3 and ANXA1, respectively) and the chloride intracellular channel protein type I (CLIC1) represent proteins with functions that are related to cell membrane.

Proteins of the annexins family associate with cell membrane phospholipids of manner calcium-dependent, and they play a role in various cellular processes such as

endocytosis, exocytosis and membrane-cytoskeleton organization (56). CLIC1 belongs to a functionally and structurally diverse group of anion selective channels, and it acts in cell membrane potential, modifying the transepithelial transport, intracellular pH and cell volume. Proteins of this group also play a role in apoptosis, adhesion, motility and cell cycle (57).

#### *Cell growth and proliferation regulators*

In this class three proteins were observed: mimecan (MIME) and both the beta and the epsilon members of family 14-3-3 (1433B and 1433E, respectively).

The MIME protein, also called osteoglycin, is one of the extracellular matrix constituents of the connective tissue, and it has an influence on extracellular matrix assembly and on cell growth and migration processes. MIME is also associated to collagen fibrillogenesis and it can act in the regulation of cell growth induced by tumor suppressor protein p53 (58). Family 14-3-3 consists of binding proteins, specifically to phosphoserine/phosphothreonine, and participates in phospho-regulated signaling pathways that determine many biological processes. The multiplicity of 14-3-3 roles indicates that this family is a key regulatory component of important processes for normal growth and cell development. These functions are frequently altered in cancer (59).

#### *Protein biosynthesis*

The 40S ribosomal protein (RSSA), also known as 60kDa laminin receptor, was identified in this class. RSSA acts as a structural ribosomal protein and is involved in translation, but this process is not well known yet (60). Due to its laminin receptor function, this protein is an important molecule in cell adhesion to the basement membrane and signal transduction. The RSSA may be relevant in tumorigenesis since its ligand, the laminin, is the main substrate for adhesion of cancer cells in the process of invasion (61).

#### *Other functions*

Seven identified proteins in 13 spots were not categorized in the classes mentioned above. These proteins include: collagen VI alpha 1 chain (CO6A1) associated glycoprotein 4 microfibril (MFAP4), dissociation inhibitors Rab/GDP-beta (GDIB), alpha-2HS glycoprotein (FETUA), alpha-1B glycoprotein (A1BG), Ran binding protein, type III (RNB3L) and the protein complement C3 (CO3).

Among these proteins, CO6A1 and MFAP4 are components of the extracellular matrix, and play several functions for the maintenance of tissue homeostasis. The increase in collagen VI expression has been associated with tumorigenesis processes, including malignant progression, migration, invasion and chemoresistance (62).

**Comparative proteomic analysis.** The same physiological conditions can be considered to CBT and the respective tumor tissues, since the collection of biological materials was carried out in a single surgical procedure of the same patient. Considering the heterogeneity of the mammary gland, this approach confers more reliability to our comparative results.

In CBT x TBT analysis, the differentially expressed spots observed in at least two paired samples were considered, resulting in an initial identification of six proteins. Davalieva and coworkers (63) described the overexpression of keratin type II cytoskeletal 8 (K2C8) in CDI tumor samples. In our study, the K2C8 was observed exclusively in the tumor tissue. The same was detected for selenium binding protein 1 (SBP1), however in spots of weak intensity, suggesting low levels of this protein in tumor. SBP1 presents a possible role in intracellular transport of selenium, hypoxia and the proteasome degradation pathway (64). Reduced levels of SBP1 have been described for various tumors, including breast cancer (65). Its low expression is associated with tumor progression and a poor prognosis (64). The alpha-enolase (ENOA) protein was observed only in healthy tissue (CBT). However, no detection in the tumor may result from technical difficulties to separate the proteins. In cancer, ENOA has been described as overexpressed, with functions in cell migration, metastasis and anaerobic proliferation of cancer cells (45). Three proteins were differentially expressed ( $p < 0.05$ ): annexin A1 (ANXA1), glycerol-3-phosphate dehydrogenase cytoplasmic NAD<sup>+</sup> (GPDA) and glutathione S-transferase P (GSTP1). Changes in ANXA1 expression have been described in various tumors, with variable expression: it is absent or greatly reduced, especially in advanced stages of progression and it is overexpressed in early stages of tumorigenesis, such as adenomas (66). In this study, ANXA1 was observed with high expression in healthy tissue compared to the tumor. The same was detected for GPDA and GSTP1.

A comparison to evaluate the similarity between both non-tumor breast tissues (contralateral and ipsilateral) was performed. The spots identified in IBT master 2D gel were compared with the proteins identified in CBT master 2D gel, resulting in matching for the majority of the spots. It suggests that these tissues present relevant similarity.



Also, the proteins identified in CBT were the same as those obtained in a previous analysis performed by our research group, with IBT (5). These data are relevant to support the use of ipsilateral tissue as a control sample in comparative studies, since the contralateral tissue is difficult to obtain.

## **Conclusion**

The proteomic method employed using 2D-PAGE and MS provided an overview of the proteins expressed by healthy breast tissues. The most common proteins observed in CBT are related to the cytoskeleton, binding/transport functions and metabolic enzymes. We also demonstrated significant similarity between contralateral and ipsilateral non-tumor breast tissues suggesting that both are good control samples in comparative studies. Qualitative and quantitative differences in the protein expression between CBT and matched primary tumors were observed and are suggestive of their importance in mammary tumorigenesis. New methods with higher resolution power can validate these data as well as the individual studies of the suggested proteins and their role in breast cancer.

## **Acknowledgments**

The Authors would like to acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária for the financial support. They also recognize the Universidade Federal do Paraná, Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba/BR and Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington DC, for providing structure and professional assistance.

**The authors declare no conflict interest.**

## **References**

- 1 Poliak K and Kalluri R: The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: 1-14, 2010.
- 2 Garnis C, Buys TP and Lam WL: Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol Cancer* 3: 9, 2004.
- 3 Calvo KR, Liotta LA and Petricoin EF: Clinical Proteomics: from biomarker discovery and cell signaling to individualized personal therapy. *Biosci Rep* 25(1-2): 107-125, 2005.
- 4 Somiari RI, Somiari S, Russell S and Shriver CD: Proteomics of breast carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815(1-2): 215-225, 2005.

- 5 Costa GG, Kaviski R, Souza LER, Urban CA, Lima RS, Cavalli IJ and Ribeiro EMSF: Proteomic analysis of non-tumoral breast tissue. *Genet Mol Res* 10(4): 2430-2442, 2011.
- 6 Cancemi P, Di Cara G, Albanese NN, Costantini F, Marabeti MR, Musso R, Lupo C, Roz E and Pucci-Minafra I: Large-scale proteomic identification of S100 proteins in breast cancer tissues. *BMC Cancer* 10: 476, 2010.
- 7 Zhang B, Barekatil Z, Kohler C, Radpour R, Asadollahi R, Holzgreve W and Zhong XY: Proteomics and biomarkers for ovarian cancer diagnosis. *Ann Clin Lab Sci* 40(3): 218-225, 2010.
- 8 Kang S, Maeng H, Kim BG, Qing GM, Choi YP, Kim HY, Kim PS, Kim Y, Kim YH, Choi YD and Cho NH: In situ identification and localization of IGHA2 in the breast tumor microenvironment by mass spectrometry. *J Proteome Res* 11(9): 4567-4574, 2012.
- 9 Tyanova S, Albrechtsen R, Kronqvist P, Cox J, Mann M and Geiger T: Proteomic maps of breast cancer subtypes. *Nat Commun* 7: 10259, 2016.
- 10 Pusch W, Flocco MT, Leung SM and Kostrzewa M: Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics* 4: 463-476, 2003.
- 11 Hendriks MM, Smit, S, Akkermans WL, Reijmers TH, Eiler PH, Hoefsloot HC, Rubingh CM, Koster CG, Aerts JM and Smilde AK: How to distinguish healthy from diseased? Classification strategy for mass spectrometry-based clinical proteomics. *Proteomics* 7(20): 3672-3680, 2007.
- 12 Parker CE, Pearson TW, Anderson NL and Borchers CH: Mass-spectrometry-based clinical proteomics – a review and prospective. *Analyst* 135(8): 1830-1838, 2010.
- 13 Cho Y, Su H, Huang T, Chen H, Wu W, Wu P, Wu D and Shiea J: Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. *Clin Chim Acta* 415: 266-275, 2013.
- 14 Ulirsch J, Fan C, Knafl G, Wu MJ, Coleman B, Perou CM and Swift-Scanlan T: Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer. *Breast cancer Res Treat* 137(2): 383-396, 2013.
- 15 Lam SW, Jimenez CR and Boven E: Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. *Cancer Treatment Reviews* 40: 129-138, 2014.
- 16 Boccardo F, Rubagotti A, Nuzzo PV, Argellati F, Savarino G, Romano P, Damonte G, Rocco M and Profumo A: Matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) TOF analysis identifies serum angiotensin II concentrations as a strong predictor of all-cause and breast cancer (BCa)-specific mortality following breast surgery. *Int J Cancer* 137(10): 2394-2402, 2015.
- 17 Milioli HH, Souza KS, Kaviski R, Santos NO, Urban CA, Lima RS, Cavalli IJ and Ribeiro EMSF: Comparative proteomics of primary breast carcinoma and lymph node metastasis outlining markers of tumor invasion. *Cancer Genomics Proteomics* 12(2): 89-101, 2015.
- 18 Costa GG, Gomig THB, Kaviski R, Souza KS, Kukolj C, Lima RS, Urban CA, Cavalli IJ and Ribeiro EMSF: Comparative proteomics of tumor and paired normal breast tissue highlights potential biomarkers in breast cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 12(5): 251-262, 2015.

- 19 Bradford MM: A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- 20 GE Healthcare Handbook: 2D – Electrophoresis: Principles and Methods. Suécia, Elanders Tofters, 2004.
- 21 Caron M, Imam-Sghiouar N, Poirier F, Le Caër J, Labas V and Joubert-Caron R: Proteomic map and database of lymphoblastoid proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771(1-2): 197-209, 2002.
- 22 Dupont A, Corseaux D, Dekeyser O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, Vincentelli A, Amouyel P, Jude B and Pinet F: The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics* 5(2): 585-596, 2005.
- 23 Pucci-Minafra I, Cancemi P, Fontana S, Minafra L, Feo S, Becchi M, Freyria A and Minafra S: Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. *Proteomics* 6(8): 2609-2625, 2006.
- 24 Pucci-Minafra I, Cancemi P, Marabeti MR, Albanese NN, Di Cara G, Taormina P and Marrazzo A: Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and non-tumoral adjacent counterparts. *Proteomics Clin Appl* 1(1): 118-129, 2007.
- 25 Hondermarck H: Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. *Mol Cell Proteomics* 2(5): 281-291, 2003.
- 26 Mayr U, Mayr M, Yin X, Begum S, Tarelli E, Wait R and Xu Q: Proteomic dataset of mouse aortic smooth muscle cells. *Proteomics* 5(17): 4546- 4557, 2005.
- 27 Salzano AM, Crescenzi M: Mass spectrometry for protein identification and the study of post-translational modifications. *Ann Ist Super Sanita* 41(4): 443-450, 2005.
- 28 Chao SK, Wang Y, Verdier-Pinard P, Yang CH, Liu L, Rodriguez-Gabin A, McDaid HM and Horwitz SB: Characterization of a human  $\beta$ V-tubulin antibody and expression of this isotype in normal and malignant human tissue. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69(8): 566-576, 2012.
- 29 Jossie SA, Hannemann J, Spötter J, Bauche A, Andreas A, Müller V and Pantel K: Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 18(4): 993-1003, 2012.
- 30 Lee H, Lim C, Cheong Y, Singh M and Gam L: Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer. *Int J Biol Sci* 8(3): 353-362, 2012.
- 31 Gross SR: Actin binding proteins - Their ups and downs in metastatic life. *Cell Adh Migr* 7(2): 199-213, 2013.
- 32 Calaf GM, Balajee AS, Montalvo-Villagra MT, Leon M, Daniela NM, Alvarez RG, Roy D, Narayan G and Abarca-Quinones J: Vimentin and Notch as biomarkers for breast cancer progression. *Oncol Lett* 7(3): 721-727, 2014.
- 33 De S, Tsimounis A, Chen X and Rotenberg SA: Phosphorylation of  $\alpha$ -tubulin by protein kinase C stimulates microtubule dynamics in human breast cells. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71(4): 257-272, 2014.

- 34 Kang S, Kim MJ, An H, Kim BG, Choi YP, Kang KS, Gao M, Park H, Na HJ, Kim HK, Yun HR, Kim DS and Cho NH: Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer. *J Proteome Res* 9(11): 5638-5645, 2010.
- 35 Van Impe K, Bethuyne J, Cool S, Impens F, Ruano-Gallego D, De Wever O, Vanloo B, Van Troys M, Lambein K, Boucherie C, Martens E, Zwaenepoel O, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Vandekerckhove J, Gevaert K, Fernández LA, Sanders NN and Gettemans JA: Nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 15(6): R116, 2013.
- 36 Hassiotou F and Geddes D: Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26(1): 29-48, 2012.
- 37 Goome PT and McCann KB: Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 10(4): 267-273, 2005.
- 38 Lamy P, Durigova A and Jacot W: Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer Iron and breast cancer. *Clin Chim Acta* 434: 34-40, 2014.
- 39 Van Gent D, Sharp P, Morgan K and Kalsheker N: Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol* 35(11): 1536-1547, 2003.
- 40 Akakura N, Hoogland C, Takada YK, Saegusa J, Ye X, Liu F, Cheung AT and Takada Y: The COOH-terminal globular domain of fibrinogen gamma chain suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 66(19): 9691-9697, 2006.
- 41 Pawlik TM, Hawke DH, Liu Y, Krishnamurthy S, Fritsche H, Hunt KK and Kuerer HM: Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. *BMC Cancer* 6: 68, 2006.
- 42 Amrita B, Nasr HB, Gabbouj S, Bouaouina N, Chouchane L and Chahed K: Apolipoprotein A1 275 G/A and +83 C/T polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in breast cancer. *Molecular Biology Reports* 38(3): 1637-1643, 2011.
- 43 Anic GM, Weinstein SJ, Mondul AM, Männistö AM and Albanes D: Serum vitamin D, vitamin D binding protein, and risk of colorectal cancer. *PLoS One* 9(7): e102966, 2014.
- 44 Diaz-Ramos À, Roig-Borrellas A, García-Melero A and López-Alemany R:  $\alpha$ -enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol* 2012: 12, 2012.
- 45 Capello M, Ferri-Borgogno S, Capello P and Novelli F:  $\alpha$ -enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J* 278(7): 1064-1074, 2011.
- 46 Leal JF, Blanco-Aparicio C, Hernández-Losa J, Ramón Y, Cajal S, Carnero A and Leonart ME: S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. *Carcinogenesis* 29(11): 2089-2095, 2008.
- 47 Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, Suziki N, Yoshino S, Iizuka N, Akada J, Kitawaga T, Oka M and Nakamura K: Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer Res* 32(8): 3219-3222, 2012.
- 48 Alamgeer M, Ganju V, Kumar B, Fox J, Hart S, White M, Harris M, Stuckey J, Prodanovic Z, Schneider-Kolsky ME and Watkins DN: Changes in aldehyde

dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 16(2): R44, 2014.

- 49 Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y, Sagara Y, Sagara Y and Tanimoto A: Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology* 59(4): 776-780, 2011.
- 50 Goncalves K, Sullivan K and Phelan S: Differential Expression And Function Peroxiredoxin 1 and Peroxiredoxin 6 in Cancerous MCF-7 and Noncancerous MCF-10A Breast Epithelial Cells. *Cancer Invest* 30(1): 38-47, 2012.
- 51 Karihtala P, Mäntyniemi A, Kang SW, Kinnula VL and Soini Y: Peroxiredoxins in Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res* 9(9): 3418-3424, 2003.
- 52 Wilkinson B and Gilbert HF: Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699(1-2): 35-44, 2004.
- 53 Thongwatchara P, Promwikorn W, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Boonyaphiphat, P and Thongsuksai P: Differential protein expression in primary breast cancer and matched axillary node metastasis. *Oncol Rep* 26(1): 185-191, 2011.
- 54 Mkrtchian S and Sandalova T: ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. *Antioxid Redox Signal* 8(3-4): 325-337, 2006.
- 55 Zhang D and Richardson DR: Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): An emerging role in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 43(1): 33-36, 2011.
- 56 Meadows SM and Cleaver O: Annexin A3 regulates early blood vessel formation. *PloS One* 10(7): e0132580, 2015.
- 57 Hervé JC: Membrane channels and transporters in cancers. *Biochimica Biophysica Acta* 1848: 2473-2476, 2015.
- 58 Tasheva ES, Koester A, Paulsen AQ, Garrett AS, Boyle DL, Davidson HJ, Song M, Fox N and Conrad GW: Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol Vis* 8: 407-415, 2002.
- 59 Freeman AK and Morrison DK: 14-3-3 Proteins: Diverse Functions in Cell Proliferation and Cancer Progression. *Semin Cell Dev Biol* 22(7): 681-687, 2011.
- 60 Malygin AA, Babaylova ES, Loktev VB and Karpova GG: A region in the C-terminal domain of ribosomal protein SA required for binding of SA to the human 40S ribosomal subunit. *Biochimie* 93(3): 612-617, 2011.
- 61 Nelson J, McFerran NV, Pivato G, Chambers E, Doherty C, Steele D and Timson DJ: The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep* 28(1): 33-48, 2008.
- 62 Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, Lee H, Temple K, Graves R, Pollard J, Chopra N, Russell RG, Sasisekharan R, Trock BJ, Lippman M, Calvert VS, Petricoin III EF, Liotta L, Dadachova E, Pestell RG, Lisanti MP, Bonaldo P and Scherer PE: Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 115(5): 1163–1176, 2005.
- 63 Davalieva K, Kiprijanovska S, Broussard C, Petrusevska G and Efremov GD: Proteomic analysis of infiltrating ductal carcinoma tissues by coupled 2D DIGE/MS/MS analysis. *Mol Bio* 46(3): 421-432, 2012.
- 64 Yang W and Diamond AM: Selenium-binding protein 1 as a tumor suppressor and a prognostic indicator of clinical outcome. *Biomarker Res* 1(1): 15, 2013.

- 65 Zhang S, Le F, Younes M, Liu H, Chen C and Yao Q: Reduced Selenium-Binding Protein 1 in Breast Cancer Correlates with Poor Survival and Resistance to the AntiProliferative Effects of Selenium. *PLoS One* 8(5): e63702, 2013.
- 66 Maschler S, Gebeshuber CA, Wiedemann E, Alakaptan M, Schreiber M, Custic I and Beug H: Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer. *EMBO Mol Med* 2(10): 401-414, 2010.